



TESIS - SK142502

**PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI
TERHADAP BIODEGRADASI DDT OLEH
*Daedalea dickinsii***

HAMDAN DWI RIZQI
NRP 1414 201 031

DOSEN PEMBIMBING
ADI SETYO PURNOMO, M.Sc., Ph.D.

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN BIOKIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016



THESIS - SK142502

THE EFFECT OF BACTERIA ADDITION ON DDT BIODEGRADATION BY *Daedalea dickinsii*

HAMDAN DWI RIZQI
NRP1414 210 031

SUPERVISOR
ADI SETYO PURNOMO, M.Sc., Ph.D.

MAGISTER PROGRAM
BIOCHEMISTRY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016

**Telah disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember**


**Oleh :
HAMDAN DWI RIZQI
NRP. 1414 201 031**

**Tanggal Ujian : Juli 2016
Tanggal Wisuda : September 2016**

Disetujui oleh :

1.  **Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.** (Pembimbing)
NIP. 19800724 200812 1 002

2.  **Prof. Mardi Santoso, Ph.D.** (Penguji)
NIP. 19650131 198910 1 001

3.  **Dr. rer. nat. Fredy Kurniawan, M.Si.** (Penguji)
NIP. 19801103 200212 2 001

4.  **Nurul Widiastuti, M.Si, Ph.D.** (Penguji)
NIP. 19710425 199412 2 001



Direktur Program Pascasarjana,


Prof. Dr. Djauhar Manfaat, M.Sc, Ph.D.
NIP. 19601202 198701 1 001

PENGARUH PENAMBAHAN BAKTERI TERHADAP BIODEGRADASI DDT OLEH *Daedalea dickinsii*

Nama : Hamdan Dwi Rizqi
NRP : 1414 201 031
Jurusan : Kimia ITS
Pembimbing : Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

Abstrak

DDT merupakan salah satu jenis pestisida organoklorin yang sulit terdegradasi yang dapat menimbulkan dampak serius terhadap manusia dan lingkungan. Beberapa metode untuk mengurangi dan memperkecil dampak penggunaan DDT telah dikembangkan termasuk dengan biodegradasi oleh jamur pelapuk coklat (BRF), namun degradasi DDT dengan menggunakan BRF masih relatif rendah dan butuh waktu inkubasi yang lama sehingga kemampuannya dalam mendegradasi DDT perlu untuk ditingkatkan. Pengaruh penambahan bakteri terhadap biodegradasi DDT oleh *Daedalea dickinsii* telah diteliti. Bakteri yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* dan *Ralstonia pickettii*. Masing-masing bakteri ditambahkan sebanyak 1, 3, 5, 7, dan 10 mL ke dalam 10 mL kultur *D. dickinsii*. Dalam penelitian ini penambahan 10 mL ($1,05 \times 10^9$ CFU/mL) bakteri *P. aeruginosa* memberikan peningkatan kemampuan degradasi tertinggi yaitu hingga mencapai 100 %. Waktu penambahan bakteri pada hari ke 0 memberikan peningkatan kemampuan degradasi DDT terbesar yaitu hingga 100 %. DDD dan DDMU terdeteksi sebagai metabolit produk yang dihasilkan selama proses degradasi DDT oleh *D. dickinsii* dan *P. aeruginosa*. Hasil dari uji interaksi antara *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* menunjukkan bahwa penambahan bakteri *P. aeruginosa* tidak memberikan hambatan terhadap pertumbuhan jamur *D. dickinsii*. Penelitian ini mengindikasikan bahwa penambahan *P. aeruginosa* dapat digunakan untuk mengoptimalkan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*.

Kata kunci: *Biodegradasi, DDT, Jamur Pelapuk Coklat, Daedalea dickinsii, Bakteria*

THE EFFECT OF BACTERIA ADDITION ON DDT BIODEGRADATION BY *Daedalea dickinsii*

Name : Hamdan Dwi Rizqi
NRP : 1414201 031
Department : Chemistry ITS
Supervisor : Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

Abstract

DDT is one of the most common persistent organochlorine pesticides (OCPs) that continues to pose serious risk to human health and the environment. Some treatment methods have been developed to reduce and minimize the adverse impacts of the use of DDT including biodegradation with brown rot fungi (BRF). However, DDT degradation using BRF has relative low and consumes long incubation time. Therefore, it needs to enhance the ability on degrading DDT. Effect of bacteria addition on biodegradation of DDT by *Daedalea dickinsii* was investigated. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Ralstonia pickettii* was bacteria sources. Each bacterium was added by 1, 3, 5, 7, and 10 mL into 10 mL of *D. dickinsii* culture. In this study, the addition of 10 mL (1.05×10^9 CFU / mL) of *P. aeruginosa* provided the highest DDT degradation ability up to 100 %. The time of adding bacteria on days 0 provided the best composition for the highest DDT degradation ability (100 %). DDD and DDMU were detected as metabolite products that produced during the process of DDT degradation by *D. dickinsii* and *P. aeruginosa*. The results of interaction assay between *D. dickinsii* with *P. aeruginosa* showed that the *P. aeruginosa* bacteria did not inhibit *D. dickinsii* growth. This study indicated that the addition of *P. aeruginosa* can be used for optimization of DDT biodegradation by *D. dickinsii*.

Keywords: Biodegradation, DDT, Brown-rot fungi, *Daedalea dickinsii*, Bacteria

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan.....	3
1.4. Batasan Masalah.....	4
1.5. Manfaat.....	4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI

2.1. Pestisida.....	5
2.2. DDT.....	6
2.3. Bioremediasi dan Biodegradasi.....	8
2.4. Jamur Pelapuk Coklat.....	10
2.5. Reaksi Fenton.....	11
2.6. <i>Daedalea dickinsii</i>	12
2.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.8. <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.9. <i>Ralstonia pickettii</i>	15
2.10. Biodegradasi DDT oleh <i>Daedalea dickinsii</i>	16
2.11. Biodegradasi DDT oleh Bakteri.....	16

2.12.	Biodegradasi DDT oleh Campuran Jamur dengan Bakteri.....	17
2.13.	Metode Analisis.....	18
2.13.1.	Spektrofotometer UV-Vis.....	18
2.13.2.	HPLC (<i>Hight Performance Liquid Chromatography</i>).....	20
2.13.3.	GC-MS.....	22

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1.	Alat dan Bahan.....	25
3.1.1.	Alat.....	25
3.1.2.	Bahan.....	25
3.2	Prosedur kerja.....	25
3.2.1.	Regenerasi Jamur <i>D. dickinsii</i>	25
3.2.2.	Regenerasi Bakteri.....	26
3.2.3.	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	26
3.2.4.	Pembuatan Kurva Standar DDT.....	26
3.2.5.	Biodegradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	26
3.2.6.	Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	27
3.2.7.	Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	27
3.2.8.	Perolehan Ulang (Recovery) DDT.....	28
3.2.9.	Identifikasi Metabolit Produk dan Prakiraan Jalur Degradasi...	28
3.2.10.	Analisis Interaksi <i>D. dickinsii</i> dengan Bakteri.....	28

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1.	Regenerasi Mikroorganisme.....	31
4.2.	Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	33
4.3.	Pembuatan Kurva Standar.....	37
4.4.	Biodegradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	38
4.5.	Biodegradasi DDT oleh Bakteri.....	41

4.6.	Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	43
4.7.	Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	46
4.8.	Identifikasi Metabolit Produk dan Prakiraan Jalur Degradasi.....	48
4.8.1.	Metabolit Produk Degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	49
4.8.2.	Metabolit Produk Degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	54
4.8.3.	Metabolit Produk Degradasi DDT oleh Campuran <i>D. dickinsii</i> dengan 10 mL <i>P. aeruginosa</i>	57
4.8.4.	Prakiraan Jalur Degradasi.....	60
4.9.	Uji Interaksi <i>D. dickinsii</i> dengan Bakteri.....	61

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1.	Kesimpulan.....	65
5.2.	Saran.....	65

DAFTAR PUSTAKA	67
-----------------------------	----

LAMPIRAN	73
-----------------------	----

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Jamur <i>Daedalea dickinsii</i>	13
Gambar 2.2. Jalur Degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	16
Gambar 2.3. Jalur Degradasi DDT oleh Bakteri.....	17
Gambar 2.4. Jalur degradasi DDT oleh Campuran Jamur <i>P. ostreatus</i> dengan Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	18
Gambar 2.5. Skema alat spektrofotometer UV-Vis.....	19
Gambar 2.6. Kurva Pertumbuhan Bakteri dengan Metode Pengukuran Turbidimetri.....	20
Gambar 2.7. Diagram blok HPLC.....	21
Gambar 2.8. Kromatogram HPLC untuk molekul DDT dan Metabolit Produk Turunannya.....	22
Gambar 2.9. Skema Instrumentasi GC-MS.....	23
Gambar 2.10. Kromatogram GC-MS untuk molekul DDT dan Metabolit Produk Turunannya.....	24
Gambar 2.11. Spektrum Massa Molekul DDT.....	24
Gambar 3.1. Posisi kultur untuk analisa interaksi <i>D. dickinsii</i> dengan bakteri.....	30
Gambar 4.1. Kurva pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i>	35
Gambar 4.2. Kurva Pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	35
Gambar 4.3. Kurva Pertumbuhan <i>R. pickettii</i>	36
Gambar 4.4. Kurva Standar DDT.....	38
Gambar 4.5. Persen Degradasi DDT oleh Bakteri.....	42
Gambar 4.6. Persen Degradasi oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dengan bakteri.....	44
Gambar 4.7. Degradasi DDT oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dan <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> (variasi waktu penambahan bakteri).....	47

Gambar 4.8.	Kromatogram GC-MS sampel degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	49
Gambar 4.9.	Spektrum MS Pirena hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	50
Gambar 4.10.	Spektrum MS pirena database.....	50
Gambar 4.11.	Spektrum MS DDE hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	51
Gambar 4.12.	Spektrum MS DDE database.....	51
Gambar 4.13.	Spektrum MS DDD hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	52
Gambar 4.14.	Spektrum MS DDD database.....	52
Gambar 4.15.	Spektrum MS DDT hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	53
Gambar 4.16.	Spektrum MS DDT database.....	53
Gambar 4.17.	Kromatogram GC-MS sampel degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	54
Gambar 4.18.	Spektrum MS DDMU hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	55
Gambar 4.19.	Spektrum MS DDMU database.....	55
Gambar 4.20.	Spektrum MS pirena hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	56
Gambar 4.21.	Spektrum MS DDD hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	56
Gambar 4.22.	Spektrum MS DDT hasil analisa sampel degradasi DDT oleh <i>P. aeruginosa</i>	57
Gambar 4.23.	Kromatogram GC-MS sampel degradasi DDT oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dengan 10 mL <i>P. aeruginosa</i>	57
Gambar 4.24.	Spektrum MS DDMU hasil analisa sampel degradasi DDT oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dengan 10 mL <i>P. aeruginosa</i>	58
Gambar 4.25.	Spektrum MS pirena hasil analisa sampel degradasi DDT oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dengan 10 mL <i>P. aeruginosa</i>	59

Gambar 4.26.	Spektrum MS DDD hasil analisa sampel degradasi DDT oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dengan 10 mL <i>P. aeruginosa</i>	59
Gambar 4.27.	Jalur degradasi DDT oleh <i>D.dickinsii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , dan campuran <i>D.dickinsii</i> dengan <i>P.aeruginosa</i>	61
Gambar 4.28.	Data Interaksi antara jamur <i>D. dickinsii</i> dengan bakteri.....	62
Gambar 4.29.	Visualisasi interaksi jamur <i>D. dickinsii</i> dengan bakteri.....	63

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Sifat Fisik dan Kimia DDT.....	7
Tabel 4.1. Data analisa HPLC hasil degradasi DDT oleh <i>D. dickinsii</i>	40
Tabel 4.2. Persen Degradasi DDT oleh Bakteri.....	41
Tabel 4.3. Data persen degradasi DDT oleh campuran <i>D. dickinsii</i> dengan bakteri.....	44
Tabel 4.4. Data Persen Degradasi DDT oleh DD-PA 10 mL variasi waktu penambahan bakteri.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Skema Kerja.....	73
Lampiran 2 : Perhitungan.....	74
Lampiran 3 : Data luas Puncak HPLC Kurva Standar DDT.....	75
Lampiran 4 : Data analisis HPLC sampel	76
Lampiran 5 : Uji Signifikansi (Uji t).....	80
Lampiran 6 : Data Interaksi Jamur <i>D. dickinsii</i> dengan Bakteri.....	83
Lampiran 7 : Fragmentasi Ion Hasil analisa GC-MS.....	84

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penggunaan pestisida di bidang pertanian semakin meningkat dalam beberapa tahun terakhir. Sebagian besar petani sudah tergantung pada pestisida sebagai pengusir serangan hama. Peningkatan ini terjadi sejak dicanangkannya program intensifikasi pertanian oleh pemerintah pada tahun 1970. Pestisida seringkali digunakan dalam upaya mengendalikan organisme pengganggu tanaman dikarenakan pestisida memiliki beberapa kelebihan misalnya dari segi penggunaan pestisida yang cukup mudah dan hasilnya yang dapat dilihat dalam waktu singkat (Suprati, 2012). Salah satu jenis pestisida yang sering digunakan adalah pestisida organoklorin.

Penggunaan pestisida organoklorin dalam bidang pertanian mulai berkembang pesat setelah masa Perang Dunia II. Pestisida organoklorin pertama yang ditemukan adalah DDT (Dikloro Difenil Trikloroetana). Senyawa tersebut disintesis pertama kali oleh Othmar Zeidler pada tahun 1873, namun efek insektisidanya baru ditemukan oleh Paul Muller pada tahun 1939 (Djojsumarto, 2008). DDT memiliki kemampuan yang baik dalam memberantas serangan hama, akan tetapi memiliki dampak negatif bagi lingkungan dan makhluk hidup. Hal ini dikarenakan DDT memiliki sifat mudah terakumulasi dalam tubuh manusia, hewan, burung, dan lingkungan (Marrs, 2004). Sifat lipofilik pada DDT mengakibatkan DDT dapat tertinggal di jaringan lemak tubuh apabila tertelan oleh manusia maupun binatang (Sumardjo, 2008). DDT memiliki waktu paruh 7-12 tahun yang menunjukkan bahwa setengah dari dosis DDT yang dikonsumsi baru akan terdegradasi setelah 7 – 12 tahun (Marrs, 2004). DDT juga dapat menjadi kontaminan berbahaya yang persisten bagi lingkungan karena sifat dari DDT yang cukup stabil dan tahan terhadap pengaruh cuaca, sehingga sulit terdegradasi.

Melihat dampak dari penggunaan DDT yang cukup berbahaya, beberapa negara maju telah mengeluarkan larangan penggunaan DDT sebagai insektisida dalam bidang pertanian. Di Indonesia, penggunaan DDT sebagai pemberantas malaria telah dilarang sejak tahun 1994. Berdasarkan Undang-undang Republik

Indonesia Nomor 32 Tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup, pemerintah juga telah melarang penggunaan bahan aktif DDT (UURI No.23, 2009). Akan tetapi, karena keefektifannya membasmi hama, kemudahan pemakaian serta harganya yang murah, membuat DDT masih sering dipergunakan sampai sekarang. Sudaryanto dkk. (2007) melaporkan bahwa residu DDT masih ditemukan di beberapa sungai, pantai dan tanah di Indonesia. Oleh karena itu dirasa perlu adanya upaya untuk mengurangi residu DDT tersebut di alam.

Untuk mengurangi dampak DDT terhadap makhluk hidup dan lingkungan, DDT dapat didegradasi dengan menggunakan cara kimia, fisika maupun secara biologis. Dalam degradasi DDT dengan cara kimia atau fisika dilakukan dengan menggunakan bantuan bahan-bahan kimia serta instrumentasi fisika yang mampu menunjang penguraiannya sehingga penguraian dapat berlangsung lebih cepat, akan tetapi kedua metode tersebut cenderung lebih mahal dan merusak lingkungan sehingga lebih baik dilakukan secara biologis. Degradasi secara biologis dilakukan dengan menggunakan bantuan aktivitas mikroorganisme. Metode biologis yang biasa digunakan adalah dengan metode biodegradasi (Purnomo dkk., 2008).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengkaji kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi DDT. Purnomo dkk. (2008) menjelaskan bahwa jamur jenis pelapuk coklat (*Brown Rot Fungi*) memiliki kemampuan untuk mendegradasi DDT dengan menghasilkan radikal hidroksi melalui reaksi Fenton. Tiap-tiap jamur pelapuk coklat memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam mendegradasi DDT (Purnomo dkk., 2008). Salah satu jenis jamur pelapuk coklat yang mampu mendegradasi DDT adalah *Daedalea dickinsii*. Purnomo dkk. (2010) melaporkan bahwa *D. dickinsii* mampu mendegradasi DDT sebesar 47% dalam media PDB selama 14 hari. Hasil degradasi DDT oleh *D. dickinsii* tersebut masih relatif rendah, sehingga perlu dilakukan modifikasi kultur untuk meningkatkan kemampuan *D. dickinsii* dalam mendegradasi DDT. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa penggunaan kultur campuran jamur dan bakteri dapat meningkatkan kemampuan degradasi kultur. Li dkk. (2008) mengemukakan penggunaan campuran jamur dan bakteri mampu meningkatkan rasio degradasi

kultur terhadap substrat limbah minyak diesel. Dalam penelitian lain Ashari (2013) dan Hermansyah (2013) menjelaskan bahwa penambahan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* mampu meningkatkan kemampuan degradasi DDT oleh jamur *Pleurotus ostreatus*.

Berdasarkan beberapa uraian diatas, pengaruh penambahan bakteri terhadap kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii* akan diuji. Dalam penelitian ini bakteri yang akan digunakan adalah bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *Ralstonia pickettii*. Ketiga jenis bakteri tersebut dipilih karena ketiganya banyak dijumpai di lingkungan khususnya tanah. Selain itu *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dipilih karena kedua bakteri tersebut memiliki kemampuan mendegradasi DDT menjadi beberapa metabolitnya yang lebih sederhana (Bidlan, 2003). Ashari (2013) dan Hermansyah (2013) melaporkan bahwa penambahan bakteri *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* mampu mengoptimalkan biodegradasi DDT oleh jamur *P. ostreatus*. Bakteri *R. pickettii* digunakan karena bakteri tersebut merupakan bakteri pendegradasi senyawa xenobiotik seperti toluena dan trikloroetilena (Ryan, 2006). Pada penelitian ini pengaruh penambahan bakteri terhadap biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii* telah diteliti, dimana bakteri yang mempunyai kemampuan terbaik dalam meningkatkan degradasi DDT oleh *D. dickinsii* dipilih, dan diidentifikasi metabolit produk serta jalur degradasinya.

1.2. Rumusan Masalah

D. dickinsii merupakan salah satu jenis jamur pelapuk coklat yang mampu mendegradasi DDT. Dalam waktu 14 hari, *D. dickinsii* mampu mendegradasi DDT sebanyak 47% (Purnomo dkk., 2008). Kemampuan tersebut relatif rendah sehingga perlu dioptimalkan dengan penambahan bakteri yang juga mempunyai kemampuan dalam mendegradasi senyawa organik polutan yang lain, sehingga diharapkan dengan penambahan tersebut kemampuan degradasinya akan naik dan waktu yang dibutuhkan juga akan lebih cepat.

1.3. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan bakteri terhadap kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*, mengidentifikasi metabolit

produk yang dihasilkan dan mengetahui interaksi antara *D. dickinsii* dengan bakteri yang digunakan.

1.4. Batasan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini dibatasi pada:

1. Jenis bakteri yang dipergunakan *P. aeruginos*, *B. subtilis* dan *R. pickettii*.
2. Variasi penambahan bakteri adalah 1, 3, 5, 7 dan 10 mL pada 10 mL kultur *D. dickinsii*, dengan volume total kultur 20 mL.
3. Variasi waktu penambahan bakteri pada kultur *D. dickinsii* pada waktu bersamaan (0 hari), 1 hari, 3 hari dan 5 hari.
4. Variabel yang diamati adalah jumlah DDT yang terdegradasi dan metabolit produk yang dihasilkan.
5. Pengamatan interaksi antara *D. dickinsii* dengan bakteri.

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

1. Memberikan data ilmiah mengenai pengaruh penambahan bakteri pendegradasi terhadap kemampuan degradasi DDT oleh jamur *D. dickinsii*.
2. Memberikan referensi yang aktual untuk menangani masalah pencemaran DDT di lingkungan khususnya dengan metode biodegradasi.
3. Memberikan alternatif penanganan masalah nasional khususnya limbah DDT dengan menggunakan jamur sebagai metode yang murah, aman, cepat dan efektif sehingga akan membantu pemerintah dalam proses pelestarian lingkungan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pestisida

Pestisida merupakan substansi kimia yang digunakan untuk membunuh atau mengendalikan berbagai macam hama. Secara harfiah pestisida terdiri dari dua kata yaitu *pest* yang berarti hama dan *cida* yang berarti pembunuh. Jadi secara sederhana pestisida dapat diartikan sebagai pembunuh hama (Sudarmo, 1991). Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian No:07/PERMENTAN/SR.140/2/2007 pestisida didefinisikan sebagai zat kimia atau bahan lain dan jasad renik serta virus yang digunakan untuk:

- a. Memberantas atau mencegah hama-hama tanaman, bagian-bagian tanaman atau hasil-hasil pertanian.
- b. Memberantas rerumputan.
- c. Mematikan daun dan mencegah pertumbuhan tanaman yang tidak diinginkan.
- d. Mengatur atau merangsang pertumbuhan tanaman atau bagian tanaman, tidak termasuk pupuk.
- e. Memberantas atau mencegah hama luar pada hewan-hewan piaraan dan ternak.
- f. Memberantas dan mencegah hama-hama air.
- g. Memberantas atau mencegah binatang-binatang dan jasad-jasad renik dalam rumah tangga, bangunan dan alat-alat pengangkutan.
- h. Memberantas atau mencegah binatang-binatang yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia atau binatang yang perlu dilindungi dengan penggunaan pada tanaman, tanah atau air.

Sesuai dengan definisi diatas maka suatu bahan akan tergolong dalam pestisida apabila bahan tersebut dibuat, diedarkan atau disimpan dengan maksud penggunaan seperti tersebut diatas (Sudarmo, 1991).

Pada umumnya pestisida yang beredar saat ini telah dalam bentuk formulasi yaitu campuran antara bahan aktif dan bahan tambahan. Bahan aktif dalam pestisida merupakan bahan kimia terpenting yang berkerja aktif dalam pestisida. Sedangkan bahan tambahannya merupakan bahan tidak aktif yang

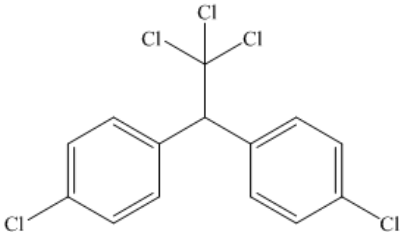
merupakan bahan-bahan pembawa lainnya. Pencampuran bahan aktif dengan bahan tambahan tersebut bertujuan agar bahan aktif mudah disimpan, diangkut, dan dapat digunakan dengan aman, efektif dan ekonomis (Afriyanto, 2008).

Secara garis besar, pestisida dibagi dalam tiga kelompok besar yaitu pestisida organoklorin (hidrokarbon berklor), organofosfat (fosfat organik), dan karbamat. Pestisida golongan organofosfat dan karbamat memiliki sifat yang lebih toksik dibandingkan pestisida golongan organoklorin serta berefek akut sehingga sering menimbulkan keracunan pada hewan. Pestisida golongan organoklorin memiliki sifat yang presisten yaitu tidak mudah terurai dan berefek kronik serta menyebabkan bioakumulasi di dalam rantai makanan. Salah satu contoh pestisida organoklorin adalah DDT (Indraningsih, 1998).

2.2. DDT

Dikloro Difenil Trikloroethana (DDT) memiliki nama IUPAC 1,1,1-trikloro-2,2-bis(*p*-klorofenil)etana. DDT termasuk dalam pestisida jenis organoklorin. Senyawa tersebut disintesis pertama kali oleh Othmar Zeidler pada tahun 1873, namun efek insektisidanya baru ditemukan oleh Paul Muller pada tahun 1939 (Djojodmarto, 2008). Secara fisik DDT memiliki tingkat hidrofobik yang tinggi, tidak berwarna, berbentuk padatan kristalin dan tidak berbau. Senyawa tersebut hampir tidak larut dalam air namun sangat larut dalam pelarut organik, lemak dan minyak. DDT diklasifikasikan oleh US EPA (US Environmental Protection Agency) sebagai senyawa dengan toksisitas moderat (memiliki LD₅₀ sebesar 50-500 mg/kg), dimana DDT memiliki LD₅₀ untuk tikus sebedar 113 mg/kg. DDT memberikan efek toksik pada serangga dengan cara membuka saluran ion garam pada syaraf serangga sehingga mengakibatkan syarafnya terbakar secara spontan. Presistensi dan toksistas DDT dapat dilihat dari sifat fisik dan kimianya dimana DDT memiliki molekul yang mengandung cincin aromatik dan atom klor dengan titik didih dan titik leleh yang tinggi serta kelarutannya yang rendah dalam air (WHO, 1979). Secara umum sifat fisik dan kimia dari DDT dijelaskan pada Tabel 2.1 sebagai berikut :

Tabel 2.1. Sifat Fisik dan Kimia DDT (Foght, 2001)

Sifat	Keterangan
Rumus Molekul	$C_{14}H_9Cl_5$
Struktur	
Massa molar	354,49 g/mol
Densitas	1,55 g/cm ³
Titik leleh	108,5-109°C
Titik didih	185-187°C
Tekanan Uap	$2,3 \times 10^{-5}$ Pa pada 20°C
Kelarutan dalam air	0,025 ppm pada 25°C
Koefisien partisi adsorpsi (K_d)	243,000

Sumber : Foght, 2001

DDT dapat disintesis dengan reaksi antara kloral (C_2HCl_3O) dan klorobenzen (C_6H_5Cl) dengan asam sulfat sebagai katalis. DDT komersial terdiri dari campuran 75% *p,p*-DDT dengan 15% *o,p*-DDT. Secara mayoritas metabolit yang dihasilkan dari penguraian DDT di alam adalah DDE (dikloro difenil dikloroetilen) dan DDD (dikloro difenil dikloroetan). DDE merupakan produk metabolit yang dihasilkan dari reaksi dehidrohalogenasi DDT, sedangkan DDD diproduksi dari reaksi reduktif deklorinasi DDT. Baik DDE maupun DDD ditemukan dalam jumlah yang kecil pada sampel DDT komersial seperti Anofex, Cezarex, Chlorophenothane, Dicophane, Dinocide, Gesarol, Gyron, Ixodex, Neocid, Neocidol dan Zerdane (WHO,1979).

DDT memiliki kemampuan yang baik dalam memberantas serangan hama, DDT juga memiliki dampak negatif bagi lingkungan dan makhluk hidup. Hal ini dikarenakan DDT memiliki sifat yang cenderung untuk terakumulasi dalam tubuh manusia, hewan, burung, dan lingkungan (Marrs, 2004). Sifat lipofilik pada DDT mengakibatkan DDT dapat tertinggal di jaringan lemak tubuh apabila tertelan oleh manusia maupun binatang (Sumardjo, 2008). DDT memiliki waktu paruh 7-12

tahun yang menunjukkan bahwa setengah dari dosis DDT yang dikonsumsi baru akan terdegradasi setelah 7-12 tahun (Marrs, 2004). DDT juga dapat menjadi kontaminan berbahaya yang persisten bagi lingkungan. Hal tersebut dikarenakan sifat dari DDT yang cukup stabil dan tahan terhadap pengaruh cuaca (Marrs, 2004).

2.3. Bioremediasi dan Biodegradasi

Bioremediasi merupakan salah satu perluasan ilmu dari bioteknologi lingkungan yang merupakan aplikasi dari penanganan polutan secara biologis. Sebagian besar bioremediasi terkonsentrasi pada penanganan polutan organik secara biologis. Metode yang dipakai adalah dengan mengubah senyawa polutan dari senyawa yang kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mendetoksifikasi polutan dengan memanfaatkan mikroorganisme. Pada umumnya mikroorganisme yang digunakan dalam bioremediasi adalah bakteri dan jamur. Salah satu metode bioremediasi yang sering digunakan adalah metode biodegradasi (Gadd, 2001).

Biodegradasi merupakan salah satu cabang dari bioteknologi lingkungan dimana memanfaatkan aktivitas mikroorganisme dalam menguraikan senyawa-senyawa besar/kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga lebih ramah lingkungan (Yani, 2003). Mikroorganisme yang dapat digunakan dalam biodegradasi adalah mikroorganisme memiliki kemampuan memanfaatkan senyawa organik alami sebagai sumber energi serta mampu menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi. Proses dekomposisi/ penguraian yang terjadi umumnya akan menghasilkan karbondioksida, metan, air, biomassa mikroba dan hasil sampingan yang lebih sederhana dibandingkan dengan senyawa awal yang didegradasi (Eris, 2006). Dalam beberapa kasus pencemaran lingkungan, biodegradasi dapat berlangsung secara alamiah. Hal tersebut disebabkan karena adanya mikroorganisme yang telah beradaptasi untuk mendegradasi polutan pada lingkungan tersebut. Adanya adaptasi tersebut ditandai dengan peningkatan laju biodegradasi polutan oleh mikroorganisme (Bollag, 1992).

Dalam melakukan biodegradasi ada beberapa metode dapat dilakukan untuk meningkatkan kecepatan biodegradasi antara lain yaitu dengan penambahan

nutrien untuk menstimulasi mikroorganisme yang biasa disebut metode indigenous (biostimulasi) dan dengan penambahan mikroorganisme yang biasa disebut sebagai metode eksogenous (bioaugmentasi). Walaupun metode biostimulasi paling dominan dilakukan, metode bioaugmentasi juga tetap dipertimbangkan sebagai metode mempercepat laju biodegradasi. Hal ini dikarenakan tidak semua mikroorganisme yang digunakan pada metode indigenous mampu mendegradasi substrat potensial yang terdapat pada campuran kompleks seperti hidrokarbon. Dengan adanya metode Bioaugmentasi dapat meningkatkan jumlah degradasi kontaminan (Walter, 1997).

Dalam melakukan biodegradasi ada beberapa faktor yang mempengaruhi agar biodegradasi dapat berjalan optimal. Faktor-faktor tersebut antara lain kadar air, suhu, pH tanah dan kadar oksigen. Kadar air sangat penting dalam proses biodegradasi, hal ini dikarenakan untuk mendegradasi mikroorganisme yang digunakan harus berada pada tingkat kelembaban tertentu. Kelembaban optimum untuk melakukan biodegradasi adalah 30-90% kapasitas penyangga air. Kelembaban yang terlalu rendah menyebabkan kekeringan dan apabila terlalu tinggi akan mengurangi penyediaan oksigen (Dibble dan Bartha, 1979). Dalam proses biodegradasi suhu lingkungan juga mempengaruhi proses dari biodegradasi, hal ini dikarenakan suhu lingkungan mempengaruhi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi dimana suhu tersebut dapat mempengaruhi reaksi-reaksi biokimia yang terjadi (Atlas, 1981). Hal lain yang mempengaruhi proses biodegradasi yaitu pH tanah. pH tanah mempengaruhi laju biodegradasi baik secara langsung maupun tidak langsung, bakteri umumnya tumbuh dengan baik pada pH 6,0-8,0. Secara tidak langsung akan mempengaruhi naik atau turunnya ketersediaan nutrisi khususnya fosfor (Udiharto, 1996). Kadar oksigen juga menjadi salah satu faktor yang berpengaruh pada biodegradasi dikarenakan dalam biodegradasi oksigen dibutuhkan sebagai akseptor elektron hal ini dikarenakan reaksi dasar dari proses biodegradasi adalah reaksi oksidasi. Kekurangan oksigen dapat menyebabkan laju biodegradasi menurun tajam (Cooney, 1984).

2.4. Jamur Pelapuk Coklat

Jamur pelapuk coklat (brown-rot fungi, BRF) secara umum tergolong dalam divisi basidiomikota. Jumlah mereka sekitar 10% dari keberagaman basidiomikota pelapuk kayu. Jamur pelapuk coklat merupakan hasil evolusi dari jamur pelapuk putih. Dalam evolusinya menjadi jamur pelapuk coklat, biomasa jamur pelapuk putih mengalami penguraian yang mengakibatkan pengurangan dan penghilangan enzim, terutama enzim selulosa dan enzim pemodifikasi lignin. Walaupun demikian jamur pelapuk coklat masih memiliki kemampuan untuk menguraikan hemiselulosa dan memodifikasi lignin secara ekstensif. Hal tersebut membuktikan bahwa jamur pelapuk coklat memiliki sistem dan alternatif lain dalam menginisiasi penyerangannya terhadap kayu (Arantes, 2012). Filley pada tahun 2002 mengemukakan hipotesis bahwa beberapa tanaman penghasil komponen lignin termodifikasi dapat membantu pembentukan hidroksi radikal pada jamur pelapuk coklat untuk mengakses hemiselulosa dan gula yang dapat dicerna. Jalur tersebut merupakan jalur yang membutuhkan energi lebih rendah dibandingkan memproduksi biomasa pembentuk enzim (Arantes, 2012).

Jamur pelapuk coklat lebih suka menyerang kayu mati dan pepohonan. Penyerangan jamur pelapuk coklat terhadap kayu menyebabkan kerusakan dan pembusukan yang cepat terhadap selulosa yang ada pada kayu sehingga lebih cepat hancur. Jamur pelapuk coklat dapat secara parsial mendekomposisi lignin dengan proses dimetoksilasi, tetapi mereka lebih menyukai mendegradasi selulosa dan hemiselulosa tanpa menghilangkan lignin yang mengelilinginya. Dalam proses pembusukan kayu, jamur pelapuk coklat harus menembus hemiselulosa terlebih dahulu untuk mengakses selulosa. Hal tersebut dikarenakan mikro fiber selulosa terbungkus oleh hemiselulosa. Mereka menghilangkan xylosa dan manosa pada hemiselulosa terlebih dahulu sebelum menghilangkan glukosa pada selulosa. Hidrolisis hemiselulosa dilakukan untuk memproduksi H_2O_2 yang dibutuhkan untuk menyerang lignoselulosa oleh jamur pelapuk coklat. Dalam tingkatan pembusukan yang lebih tinggi, kayu akan menjadi semakin gelap dan menjadi kecoklatan. Hal tersebut mengindikasikan adanya proses modifikasi lignin pada kayu. Dengan demikian kayu akan kehilangan kekuatannya dan pada

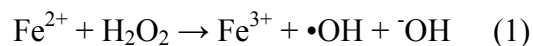
akhir degradasi tipikal kayu menjadi seperti kubus, berkerut, dan lunak sehingga mudah diuraikan menjadi serbuk coklat (Niemenmaa, 2008).

Dalam proses pembusukan kayu jamur pelapuk coklat secara khas mengawalinya dengan masuk ke lapisan dalam dinding sel kayu, sementara itu lapisan lamela tengah yang kaya akan lignin tidak terdegradasi. Hal tersebut menunjukkan adanya partisipasi dari agen yang dapat berdifusi dengan ukuran lebih kecil dari enzim dan memiliki buffer atau zona penghalang diantara hifa jamur dan lignoselulosa yang sedang mengalami degradasi (Arantes, 2012).

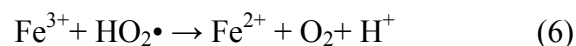
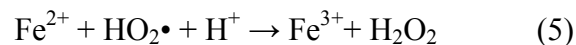
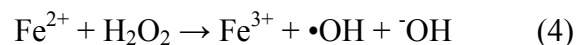
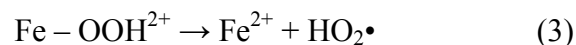
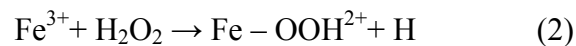
2.5. Reaksi Fenton

Reaksi Fenton pertama kali ditemukan oleh H.J.H. Fenton yang mengamati oksidasi asam tartarat oleh H_2O_2 dengan adanya ion besi. Reaksi Fenton didefinisikan sebagai reaksi oksidasi substrat organik oleh besi(II) dan hidrogen peroksida. Dalam reaksi Fenton reagen yang digunakan dinamakan reagen Fenton yang terdiri dari campuran hidrogen peroksida dan ion besi. Reaksi Fenton dikenal sebagai metode yang efektif untuk mengoksidasi polutan organik (Barbusinski, 2009).

Secara umum reaksi Fenton yang melibatkan ion besi dan H_2O_2 akan menghasilkan hidroksi radikal. Hidroksi radikal tersebut merupakan senyawa reaktif yang akan mengoksidasi substrat organik pada reaksi Fenton. Mekanisme reaksi Fenton dapat digambarkan sebagai berikut:



Selanjutnya Fe^{3+} yang dihasilkan memunculkan mekanisme reaksi radikal berantai sebagai berikut:



Dari keseluruhan persamaan reaksi diatas (Persamaan 1-6) dapat dibagi menjadi dua fase reaksi. Fase reaksi pertama adalah reaksi antara Fe^{2+} dan H_2O_2 dimana Fe^{2+} akan teroksidasi menjadi Fe^{3+} dan H_2O_2 akan terdekomposisi membentuk hidroksi radikal. Selanjutnya akan terjadi fase reaksi kedua yang

melibatkan urutan reaksi berantai yang disebabkan oleh reaksi antara Fe^{3+} dengan H_2O_2 atau $\text{HO}_2\bullet$. Dalam fase reaksi kedua tersebut akan menghasilkan siklus reaksi dengan adanya pembentukan Fe^{2+} (Arantes, 2012).

Reaksi Fenton pada jamur pelapuk coklat juga telah dikembangkan untuk mendegradasi polutan organik. Purnomo dkk. (2008) telah menguji kemampuan jamur pelapuk coklat untuk mendegradasi DDT. Uji keterlibatan reaksi Fenton pada degradasi DDT dilakukan dengan membandingkan metabolit produk hasil dari degradasi menggunakan reagen Fenton dengan metabolit produk hasil degradasi menggunakan jamur pelapuk coklat. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa metabolit produk hasil degradasi dengan reagen Fenton sama dengan metabolit produk hasil degradasi dengan jamur pelapuk coklat. Hal tersebut menunjukkan bahwa degradasi DDT oleh jamur pelapuk coklat juga melibatkan reaksi Fenton (Purnomo dkk., 2008).

2.6. *Daedalea dickinsii*

Daedalea dickinsii merupakan spesies jamur yang tergolong dalam *brown rot fungi* / jamur pelapuk coklat. Jamur ini pertama kali ditemukan oleh Yasuda asal Jepang pada tahun 1922. *D. dickinsii* tersebar pada daerah beriklim sedang di Asia, mulai dari India, Jepang dan banyak ditemukan di Taiwan. Jamur ini merupakan organisme saprofit yang biasa ditemukan di kayu keras dan sebagian besar sering ditemukan di pepohonan. Taksonomi dari *D. dickinsii* adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Fungi
Divisi	: Basidiomycota
Kelas	: Agaricomycetes
Ordo	: Polyporales
Famili	: Fomitopsidaceae
Marga	: Daedalea
Spesies	: <i>D. dickinsii</i>

(Lindner, 2011).

D. dickinsii memiliki beberapa ciri fisik. Beberapa ciri fisik tersebut diantaranya adalah memiliki basidiokarp yang mampu tumbuh bertahun-tahun. Bentuknya pipih tidak bertangkai dengan ukuran panjang mencapai 20 cm, lebar

10 cm, dan tebal 5 cm dengan tepian yang tumpul. Jamur ini memiliki tiga macam hifa. Ketiga macam hifa tersebut antara lain: hifa generatif, hifa skeletal dan hifa pengikat. Hifa generatifnya membentuk himpitan-himpitan, transparan, memiliki lebar 1,5-3 μm . Hifa skeletalnya berwarna transparan sampai coklat pucat. Hifa skeletal memiliki bentuk tebal dan hampir padat, tidak bercabang dengan lebar antara 2,4-4,5 μm . Hifa pengikatnya bercabang dengan lebar mencapai 2,5 μm . *D. dickinsii* memiliki basidia dengan ukuran 18-25 x 4,5-6 μm dengan empat sterigma. Selain itu jamur ini juga memiliki basidiospora berbentuk silinder dengan ukuran 4-5,5 x 1,8-2,5 μm . Bentuk fisik jamur *D. dickinsii* dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Lindner, 2011).



Gambar 2.1 Jamur *Daedalea dickinsii* (Lindner, 2011)

2.7. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang biasa ditemukan di tanah. Bakteri ini termasuk dalam jenis bakteri gram-negatif. *P. aeruginosa* hidup secara aerob. Metabolisme *P. aeruginosa* terjadi secara aerob fakultatif dan tidak pernah secara fermentasi. Walaupun hidup secara aerob bakteri ini tetap bisa tumbuh dalam kondisi tanpa adanya O_2 . Hal tersebut dapat terjadi apabila dilingkungannya tersedia NO_3 atau senyawa lain yang mampu berperan sebagai akseptor elektron pernapasan. Bakteri ini tumbuh secara optimum pada suhu 37°C dan masih dapat tumbuh pada suhu 42°C. *P. aeruginosa* memproduksi dua jenis pigmen larut yaitu pigmen fluoresen *pyoverdin* dan pigmen biru *pyocyanin*. *Pyocyanin* dapat diproduksi melimpah pada media yang mengandung sedikit zat besi (Todar, 2008).

P. aeruginosa bersifat patogen oportunistik terhadap manusia. Oportunistik karena bakteri ini jarang menyerang orang sehat. Sebaliknya, bakteri ini sering berkolonisasi pada seseorang yang menderita gangguan sistem kekebalan tubuh,

seperti kista fibrosis, kanker, atau AIDS (Todar, 2008). Walaupun bersifat pantogen, keberadaan bakteri ini di alam sangatlah penting. Hal tersebut dikarenakan *P. aeruginosa* memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon aromatik polisiklik, detoksifikasi lingkungan dari zat kimia sintetik dan pestisida (Todar, 2008).

Taksonomi dari bakteri *P. aeruginosa* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobakteria
Kelas	: Gamma Proteobakteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Spesies	: <i>P. aeruginosa</i>

(Todar, 2008).

2.8. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri yang umumnya ditemukan di tanah. *B. subtilis* tidak tergolong sebagai bakteri patogen bagi manusia. Bakteri ini memiliki bentuk basil (batang) dan merupakan bakteri gram positif. Bakteri ini memiliki flagel yang masif sehingga dapat bergerak cepat untuk ukuran bakteri (Madigans dkk., 1998). Bakteri jenis ini memiliki endospora yang letaknya di tengah. Bakteri ini tersusun atas *peptidoglycan*, yang merupakan polimer dari gula dan asam amino. Organisme ini dapat menghasilkan antibiotik selama *sporulation* (masa pembentukan spora). Contohnya *polymyxin*, *difficidin*, *subtilin*, dan *mycobacillin*. *B. subtilis* memiliki kemampuan mendegradasi polimer seperti protein, pati, dan pektin, sehingga bakteri ini memiliki peran yang sangat penting dalam siklus karbon dan nitrogen (Madigans dkk., 1998).

B. subtilis juga umum digunakan sebagai organisme model dalam mikrobiologi, terutama untuk model studi bakteri gram positif. *B. subtilis* memiliki karakteristik gram positif, oleh karena itu tampak berwarna ungu kebiruan setelah diperlakukan dengan pewarnaan gram. Dari hasil pengamatan, *B. subtilis* tampak memiliki bentuk batang memanjang, dapat hidup secara soliter

ataupun membentuk koloni bergandengan memanjang (Madigans dkk., 1998). *B. subtilis* merupakan bakteri mesofilik, karenanya bakteri ini dapat tumbuh secara optimum pada suhu antara 15-45°C (Rahayu, 1990).

B. subtilis memiliki taksonomi sebagai berikut:

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Marga	: Bacillus
Spesies	: <i>B. subtilis</i>

(Madigans dkk., 1998).

2.9. *Ralstonia pickettii*

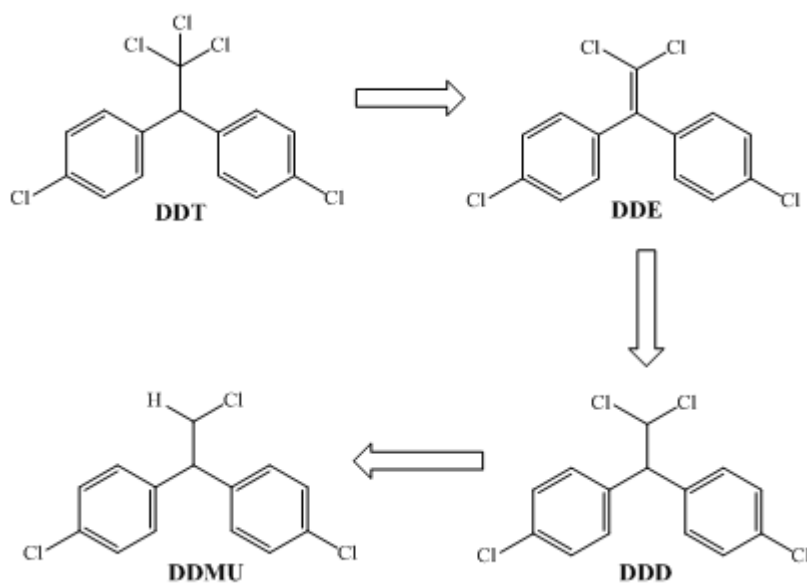
Ralstonia pickettii merupakan bakteri yang umumnya ditemukan di air dan tanah. *R. pickettii* merupakan bakteri jenis gram negatif dan merupakan oksidase positif. Bakteri ini memiliki bentuk basil (batang) dan melakukan respirasi secara aerob atau non fermentasi. Bakteri ini memiliki sifat patogen oportunistik baik pada kondisi rumah sakit maupun kondisi lingkungan (Ryan dkk., 2006). *R. pickettii* merupakan salah satu spesies dari genus *Ralstonia* yang banyak dijumpai pada lingkungan tandus, tercemar, oligotrofik atau lingkungan dengan nutrisi terbatas. Dalam penelitian lainnya Ryan dkk. (2007) melaporkan bahwa *R. pickettii* mampu mendegradasi polutan xenobiotik seperti toluena dan trikloroetilena sebagai limbah industri. *R. pickettii* memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Betaproteobacteria
Ordo	: Burkholderiales
Famili	: Burkholderiaceae
Marga	: Ralstonia
Spesies	: <i>R. pickettii</i>

(Ryan dkk., 2006)

2.10. Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Beberapa penelitian tentang biodegradasi DDT telah dilaporkan. Salah satunya dengan menggunakan jamur pelapuk coklat *D. dickinsii*. Degradasi dilakukan dalam media PDB selama 14 hari pada suhu 30°C. Dari proses degradasi yang dilakukan diperoleh hasil *D. dickinsii* mampu mendegradasi sebesar 47% DDT. Metabolit produk yang dihasilkan adalah 24% berupa DDE dan 20% DDD. Kuantitas yang hampir sama antara kemampuan degradasi dengan metabolit produk yang dihasilkan menunjukkan bahwa tidak ada metabolit produk lain yang dihasilkan selain DDE dan DDD. Konsentrasi DDE yang lebih besar dalam kultur menunjukkan bahwa DDE merupakan produk utama dari degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. DDE dihasilkan dari reaksi monohidroksilasi dan eliminasi gugus klor pada DDT. Sedangkan DDD dihasilkan dari reaksi reduktif deklorinasi. Saat DDD ditambahkan sebagai substrat pada kultur *D. dickinsii* ternyata DDD mampu diubah oleh *D. dickinsii* menjadi DDMU (Purnomo dkk., 2010). Jalur degradasi DDT oleh *D. dickinsii* digambarkan pada Gambar 2.2.

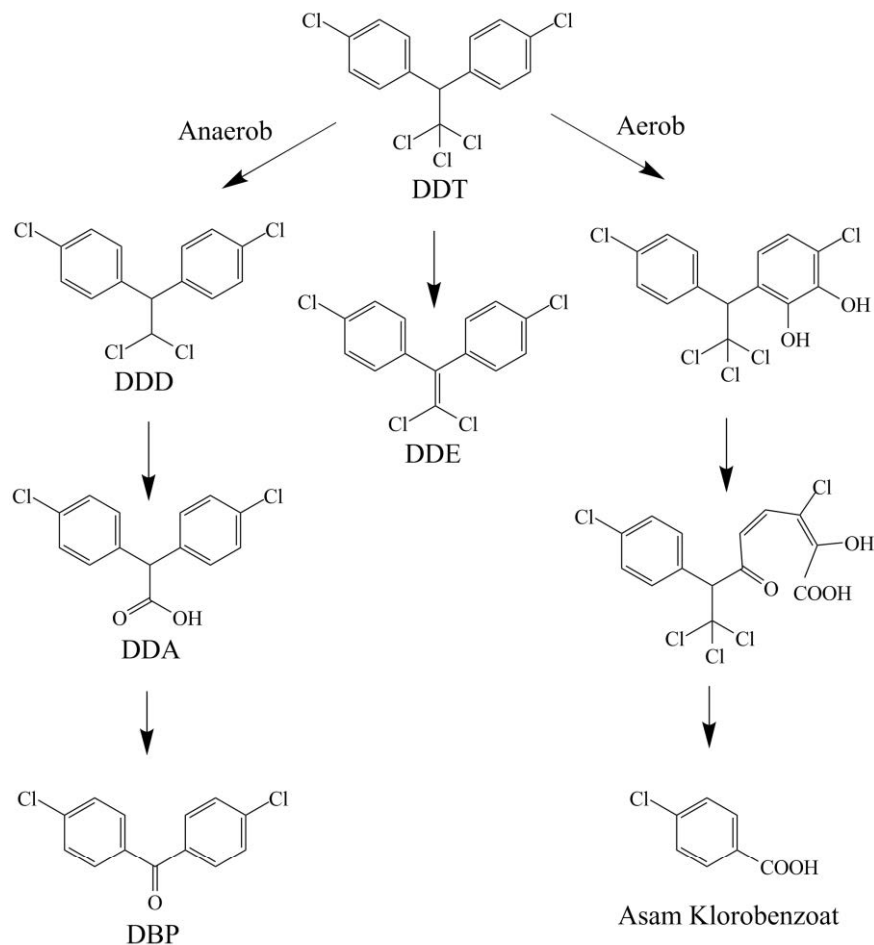


Gambar 2.2 Jalur Degradasi DDT oleh *D. dickinsii* (Purnomo dkk., 2010).

2.11. Biodegradasi DDT oleh Bakteri

Beberapa penelitian tentang degradasi DDT oleh bakteri telah dilakukan. Secara umum bakteri bakteri mampu mendegradasi DDT melalui dua cara yaitu secara anaerob dan secara aerob (Aislabie dan Jones, 1995). Degradasi DDT

secara anaerob oleh bakteri dilakukan tanpa adanya oksigen. Sebagian besar proses degradasi DDT secara anaerob melibatkan reaksi deklorinasi DDT menjadi DDD dan metabolit lainnya seperti DDMU, DDA dan DBP dalam kondisi anaerob. Dalam mekanisme degradasi DDT secara aerob, DDT mengalami oksidasi oleh enzim dioksigenase untuk membentuk turunan hidroksi yang mengalami pemutusan meta sehingga membentuk produk akhir asam klorobenzoat. Jalur degradasi DDT oleh bakteri digambarkan pada Gambar. 2.3. (Aislabie dan Jones, 1995).

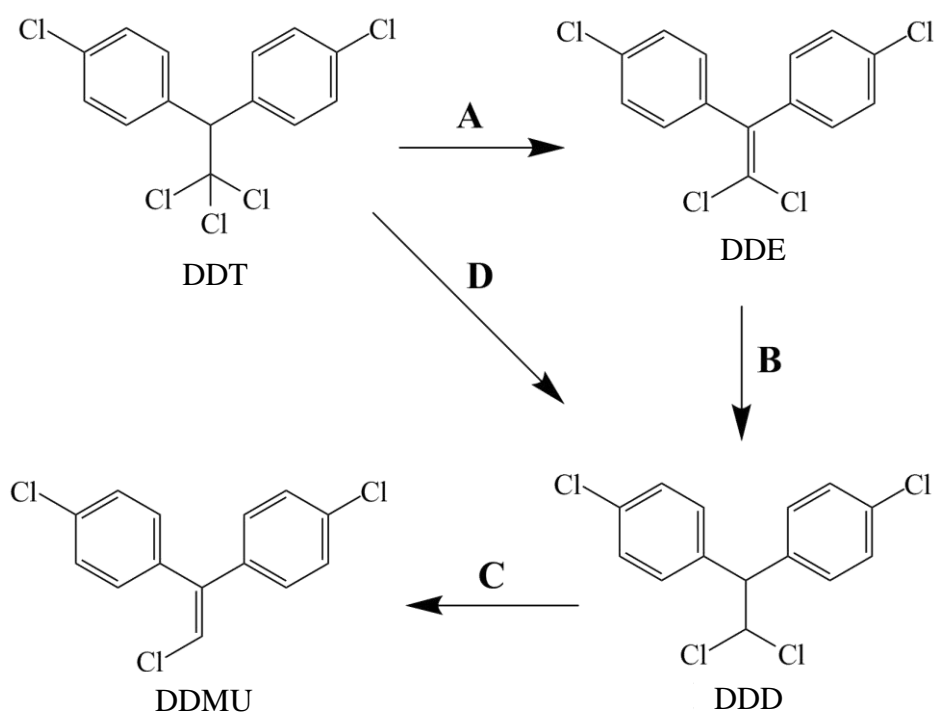


Gambar 2.3. Jalur degradasi DDT oleh Bakteri (Aislabie dan Jones, 1995)

2.12. Degradasi DDT oleh Campuran Jamur dengan Bakteri

Biodegradasi DDT oleh campuran jamur dan bakteri sebelumnya telah dilakukan oleh Ashari (2013) yang melakukan degradasi DDT oleh jamur *Pleurotus ostreatus* dengan penambahan bakteri *P. aeruginosa*. Dalam penelitian tersebut penambahan 3 mL bakteri *P. aeruginosa* mampu meningkatkan

kemampuan degradasi *P. ostreatus* dari 19,34% (tanpa penambahan bakteri) menjadi 85,74%. Dalam proses degradasi DDT oleh campuran jamur *P. ostreatus* dengan bakteri *P. aeruginosa*, DDD, DDE dan DDMU ditemukan sebagai metabolit produk yang dihasilkan selama proses degradasi. DDT dirubah menjadi DDE dengan melibatkan reaksi dehidroklorinasi. DDD dapat terbentuk dari reaksi deklorinasi pada DDT ataupun reaksi Hidrogenasi pada DDE. Metabolit produk DDMU terbentuk melalui reaksi deklorinasi yang terjadi pada DDD. Jalur degradasi DDT oleh jamur *P. ostreatus* dengan adanya penambahan bakteri *P. aeruginosa* digambarkan pada Gambar 2.4 (Ashari, 2013).



Gambar 2.4. Jalur degradasi DDT oleh campuran Jamur *P.ostreatus* dengan bakteri *P. aeruginosa*. A : reaksi dehidroklorinasi, B : Reaksi Hidrogenasi, C : Reaksi deklorinasi, D : Reaksi deklorinasi (Ashari, 2013)

2.13. Metode Analisis

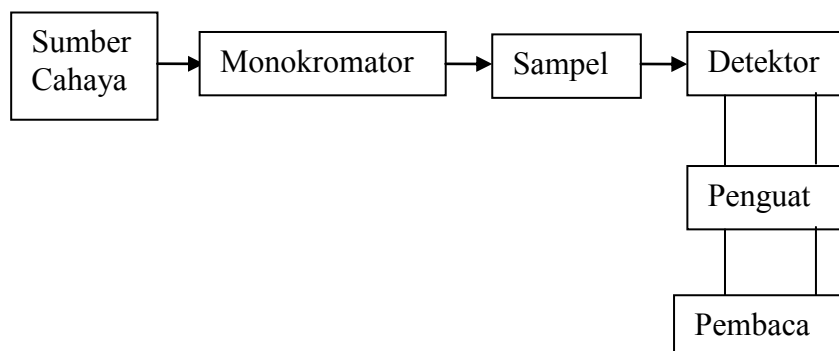
2.13.1. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan instrumentasi yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi antara kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah sinar

ultraviolet (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm). Jangkauan panjang gelombang yang tersedia untuk pengukuran membentang dari panjang gelombang pendek ultraviolet sampai ke garis inframerah (Skoog, 1998).

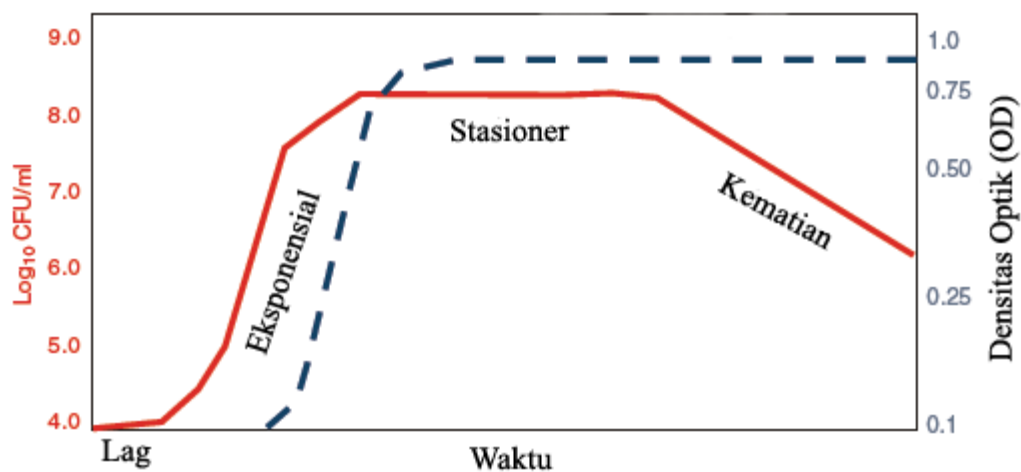
Prinsip dari spektrofotometri UV-Vis adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (diabsorpsi). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mangabsorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah absorbansi (A). Nilai absorbansi setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui pada suatu point dimana presentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi diukur dengan phototube (Harmita, 2006).

Data yang diperoleh dengan spektrofotometri UV-Vis biasanya berupa panjang gelombang maksimum (λ maks). Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang dimana terjadinya eksitasi elektronik yang memberikan absorban yang terbesar. Penentuan panjang gelombang maksimum yang pasti (tetap) dapat dipakai untuk identifikasi molekul yang bersifat karakteristik sebagai data sekunder. Dengan demikian spektrum UV-Vis dapat dipakai untuk tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif hanya dipakai sebagai data pendukung yang perhitungannya memakai kaidah Woodward dan kaidah Fisher-Kuhn. Sedangkan pokok kegunaan analisis spektrofotometri UV-Vis adalah untuk analisis kuantitatif karena melibatkan energi eksitasi yang cukup besar (Mulja dan Suharman, 1995). Secara umum skema alat spektrofotometer UV-Vis dijelaskan pada Gambar 2.5.berikut:



Gambar 2.5. Skema alat spektrofotometer UV-Vis (Mulja dan Suharman, 1995).

Dalam penelitian ini instrumentasi UV-VIS digunakan dalam pembuatan kurva pertumbuhan bakteri. Kurva pertumbuhan bakteri merupakan kurva yang menunjukkan fase-fase pertumbuhan bakteri (Maier, 2009). Pembuatan kurva pertumbuhan dalam penelitian ini dilakukan dengan metode turbidimetri pada *optical density* OD₆₀₀. Metode Turbidimetri merupakan metode pengukuran jumlah sel bakteri berdasarkan kekeruhan. Metode ini mengukur pengurangan intensitas cahaya pada spektrofotometer akibat adanya penghamburan cahaya oleh sel-sel bakteri yang ada pada kuvet. Adanya penghamburan cahaya tersebut mengakibatkan turunnya intensitas cahaya yang akan dinotasikan sebagai suatu nilai. Semakin besar nilai tersebut menunjukkan semakin banyak jumlah sel bakteri yang ada didalam kuvet (Widdel, 2010). Contoh kurva pertumbuhan dengan metode turbidimetri digambarkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Kurva pertumbuhan bakteri dengan metode pengukuran turbidimetri (Maier, 2009)

2.13.2. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

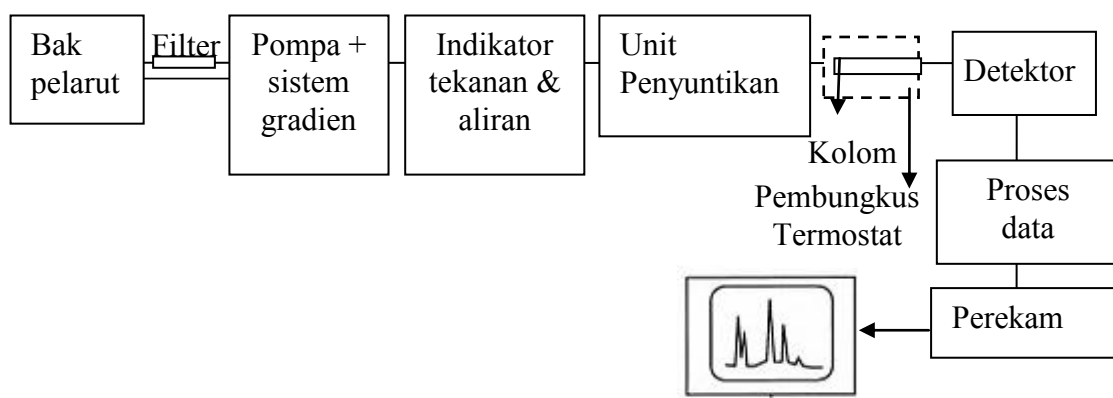
HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan teknik kromatografi cair yang biasa digunakan untuk memisahkan dan menentukan komponen senyawa dalam berbagai bahan organik, anorganik dan biologi. Dalam kromatografi cair fase geraknya merupakan pelarut cair yang mengandung sampel sebagai zat terlarut. Jenis-jenis dari kromatografi cair diklasifikasikan berdasarkan mekanisme pemisahan atau jenis diamnya. Beberapa jenis kromatografi cair antara lain partisi atau kromatografi cair-cair, adsorpsi atau kromatografi cair-

padat, pertukaran ion atau kromatografi ion, kromatografi size exclusion, kromatografi afinitas dan kromatografi kiral (Skoog, 2013).

Prinsip dasar pemisahan HPLC adalah perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen dalam sampel yang terjadi karena adanya perbedaan keseimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak. HPLC memiliki efektifitas yang lebih baik dibandingkan LC biasa hal ini dikarenakan HPLC menggunakan kolom dengan diameter 3-5 mm dengan ukuran panjang 5-25 cm dan ukuran partikel fase diam yang lebih kecil yaitu sekitar 3-10 μm . Dengan ukuran partikel fase diam yang lebih kecil tersebut laju aliran dapat diperbesar dengan tekanan yang tinggi sehingga waktu retensinya singkat dan analisis berlangsung lebih cepat (Skoog, 2013).

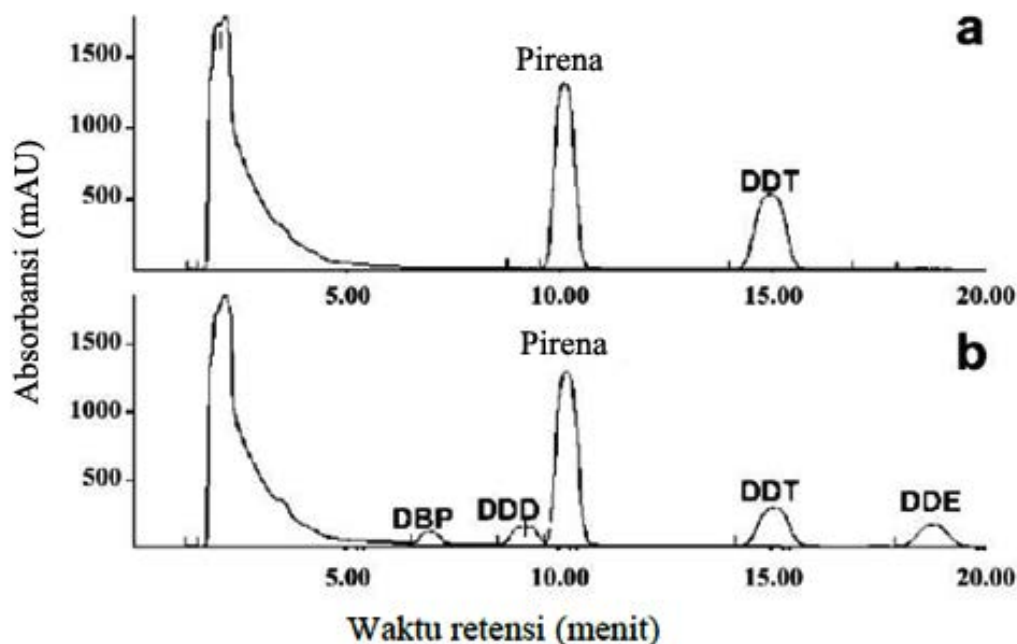
Dalam HPLC terdapat dua jenis metode elusi. Kedua metode tersebut antara lain metode isokratik dan metode gradien. Metode isokratik merupakan metode elusi dengan campuran pelarut atau pelarut tunggal dengan menggunakan perbandingan komposisi yang konstan. Metode gradien merupakan metode elusi dengan dua atau lebih sistem pelarut yang berbeda secara signifikan dalam polaritasnya dan menggunakan beberapa variasi perbandingan komposisi pelarut dalam waktu pemisahannya. Dengan adanya variasi perbandingan komposisi pelarut dalam elusi akan meningkatkan efisiensi dari pemisahannya (Skoog, 2013).

Secara umum diagram blok dari HPLC digambarkan pada Gambar 2.7. sebagai berikut :



Gambar 2.7. Diagram blok HPLC (Harris, 2007).

Contoh hasil analisa HPLC untuk sampel DDT dan beberapa metabolit produknya digambarkan pada Gambar 2.8. sebagai berikut:



Gambar 2.8. Kromatogram HPLC untuk molekul DDT dan metabolit produk turunannya (Purnomo dkk, 2008)

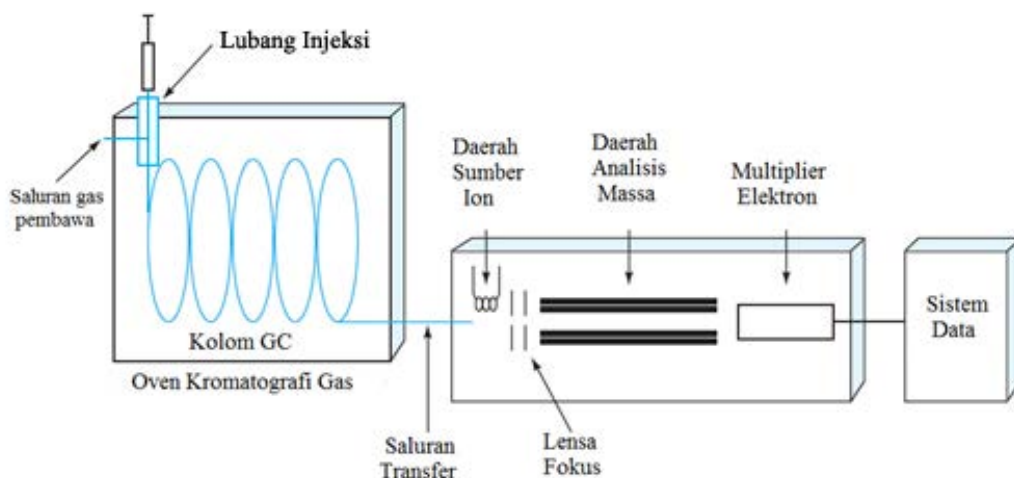
2.13.3. GC-MS

GC-MS merupakan instrumentasi perpaduan antara Kromatografi Gas (GC) dengan Mass Spektrometer (MS) sebagai detektornya. Dalam instrumentasi ini GC berperan sebagai pemisah komponen sampel dan MS memiliki peran sebagai detektor untuk mengidentifikasi komponen yang telah terpisah (Skoog, 2013).

Pada GC komponen dari sampel akan diuapkan dan dipisahkan berdasarkan kecepatan distribusinya diantara fase gerak yang berupa gas dengan fase diam yang dapat berupa padatan atau cairan yang ada didalam kolom. Pada pemisahan dengan kromatografi gas sampel diuapkan dan diinjeksikan kedalam kolom. Elusi akan dibawa oleh aliran fase gerak yang berupa gas inert. Dalam kromatografi, fase gerak yang digunakan tidak boleh berinteraksi atau bereaksi dengan sampel. Fungsi dari fase gerak hanya sebagai alat transportasi analat melewati kolom. Interaksi sampel akan terjadi di dalam kolom (fase diam) dimana komponen sampel yang berinteraksi lebih kuat dengan fase diam akan tertahan dan yang interaksinya lebih lemah akan keluar dari kolom terlebih dahulu (Skoog, 2013).

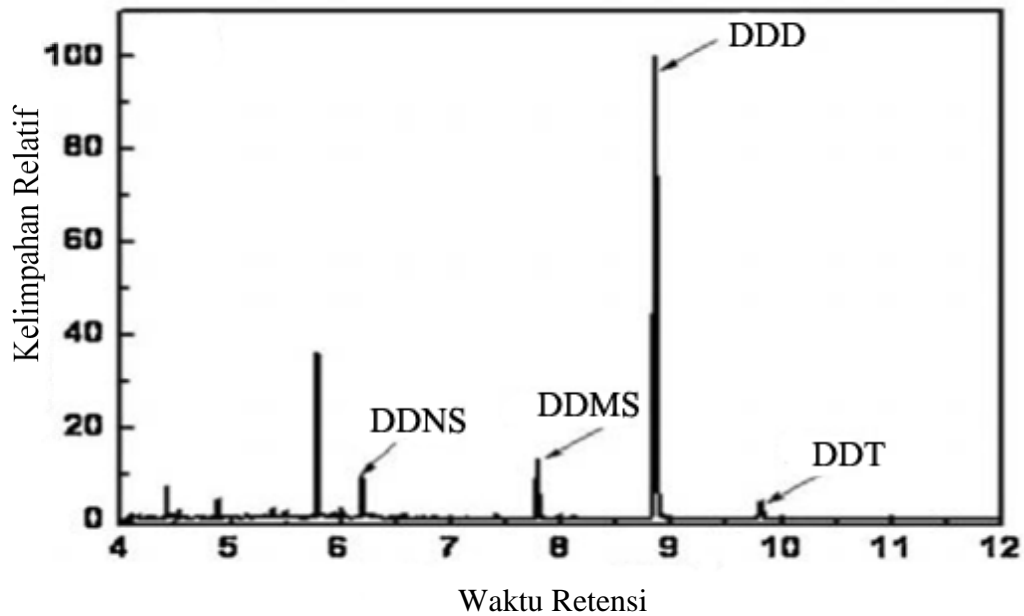
Pada instrumentasi GC out put yang dihasilkan berupa kromatogram dengan intensitas sebagai fungsi waktu retensi. Waktu retensi sangat berguna untuk mengidentifikasi komponen yang terdapat dalam campuran sampel. Data waktu retensi dapat digunakan sebagai identifikasi kualitatif sampel sedangkan data luas puncak kromatogram dapat digunakan untuk menentukan kadar komponen campuran dalam sampel (Skoog, 2013).

Pada GC-MS komponen hasil pemisahan akan dideteksi oleh detektor spektrometer massa (MS). Detektor MS pada GC-MS berperan mengukur rasio massa terhadap muatan (m/z) dari ion yang telah dipisahkan dari sampel setelah pemisahan dengan GC. Laju alir sampel dari kolom biasanya cukup rendah sehingga dapat langsung dihubungkan dengan *ionization chamber* pada spektrometer massa. Pada GC-MS, spektrometer massa melakukan scan massa secara berulang selama percobaan kromatografi. Apabila kromatografi berjalan 10 menit maka proses scanning oleh spektrometer massa dilakukan berulang setiap detiknya selama 10 menit dan akan terekam 600 spektrum massa. Data yang diperoleh dapat dianalisis dengan beberapa cara. Pertama, kelimpahan ion disetiap spektrum dapat dijumlahkan dan di plot sebagai fungsi waktu memberikan total ion kromatogram. Kedua, spektrum masa dapat ditampilkan pada waktu tertentu selama waktu yang ada pada kromatogram untuk mengidentifikasi senyawa yang terelusi pada waktu tersebut. Dengan demikian nilai (m/z) nya dapat dipilih dan diamati sepanjang percobaan kromatografi berlangsung (Skoog, 2013). Secara umum skema dari instrumen tasi GC-MS di gambarkan pada Gambar 2.9.

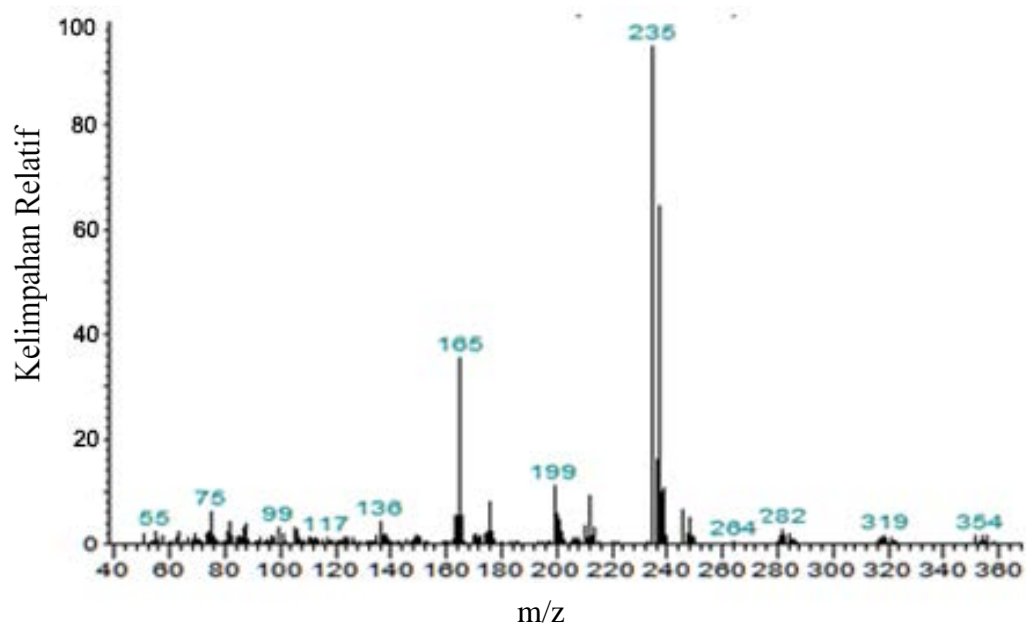


Gambar 2.9. Skema Instrumentasi GC-MS (Skoog,2013).

Contoh kromatogram GC-MS dan spektrum MS untuk molekul DDT digambarkan pada Gambar 2.10. dan 2.11.



Gambar 2.10. Kromatogram GC-MS untuk molekul DDT dan metabolit produk turunannya (Kang dkk., 2016)



Gambar 2.11. Spektrum massa molekul DDT (Ashari, 2013)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan steril, jarum ose, mikro pipet, pipet, erlenmeyer berpenutup, erlenmeyer, erlenmeyer vakum, sumbat spons, gelas ukur, kaca alroji, gelas beker, labu bundar, corong kaca, botol ampul, pompa penyedot, corong buchner, corong pisah, filter whatman 0, 2 μ m diameter 110 mm, neraca analitik (OHAUS), ultrasonic cleaner, evaporator, autoclave (TOMY, ES-315), inkubator Thermostatchrank/Thermostatic Cabinet/Armoire Thermoregulatrice (Laviband) dan *Shaker Inkubator* Excella E 25 (New Brunswick), sedangkan untuk proses analisis digunakan instrumentasi Spektrofotometer SP-300 (Optima), HPLC (JASCO MD-1510) dan GCMS (Agilent 7890A).

3. 1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *Daedalea dickinsii* NBRC 3116, bakteri *Bacillus subtilis*, *Pseodomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii* NBRC 102503, DDT (1,1,1-trikloro-2,2-bis(4-klorofenil)etana), *Potato Dextrose Agar* (PDA) dari Merck, *Potato Dextrose Broth* (PDB) dari Difco, *Nutrient Borth* (NB) dari Merck, *Nutrient Agar* (NA) dari Merck, metanol, aseton, aqua DM, Na₂SO₄, *n*-heksana, dimetilsulfoksida (DMSO).

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Regenerasi Jamur *D. dickinsii*

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur pelapuk coklat dari spesies *D. dickinsii*. Jamur ini diperoleh dari koleksi jamur Labolatorium Kimia Mikroorganisme Jurusan Kimia FMIPA ITS. Jamur ini diinokulasikan dengan diameter miselium 1cm kedalam cawan petri yang berisi medium agar steril (PDA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari sampai seluruh permukaan medium tertutupi miselium (Purnomo dkk., 2010).

3.2.2. Regenerasi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa* dan *R. pickettii*. Bakteri-bakteri tersebut diperoleh dari koleksi bakteri Laboratorium Kimia Mikroorganisme Jurusan Kimia FMIPA ITS. Ketiga jenis bakteri tersebut masing-masing diambil satu ose dan diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Ashari, 2013).

3.2.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk ketiga jenis bakteri yang telah diregenasi. Masing-masing bakteri hasil regenerasi di ambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan kedalam 10 mL NB. Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi dishaker dengan kecepatan 180 rpm. Sebanyak 1 mL kultur dimasukkan kedalam 450 mL PDB medium dan diukur optikal densitinya pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dengan spektrofotometri UV-Vis tiap 1 jam sekali. Kurva dibuat dengan absorbansi sebagai fungsi waktu. Apabila biakan telah mencapai fase kematian yang ditandai dengan adanya penurunan absorbansi, maka pengukuran dihentikan (Ashari, 2013).

3.2.4. Pembuatan Kurva Standar DDT

Larutan DDT dengan konsentrasi sebesar 25, 50, 75, 100 % (100% = 0,25 µmol DDT yang berasal dari 50 µL DDT 5 mM), ditambahkan 50 µL piren 5 mM kedalam masing-masing larutan sebagai internal standar. Sampel dianalisa menggunakan HPLC dengan fasa gerak metanol 82%. Kurva dibuat dengan nilai perbandingan luas area puncak DDT/piren sebagai fungsi konsentrasi DDT (Purnomo dkk., 2010).

3.2.5. Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Kultur *D. dickinsii* hasil regenerasi diambil miseliumnya dengan diameter 1cm kemudian diinokulasikan kedalam 10 mL media PDB, dan kemudian dipre-inkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C dalam kondisi statis. Selanjutnya kultur ditambah 50 µL DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir: 0,25 µmol DDT/labu). Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip untuk mencegah penguapan DDT. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada

suhu 30°C. Sebagai kontrol, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT (Ashari, 2013).

3.2.6. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Kultur jamur hasil regenerasi di-preinkubasi pada 10 mL media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C, kemudian ditambah dengan masing-masing kultur bakteri hasil pre-inkubasi (sesuai waktu fasa stasioner bakteri) dengan konsentrasi 1, 3, 5, 7 dan 10 mL dengan volume total 20 mL. Masing-masing kultur ditambah 50 µL DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir 0,25 µmol DDT/labu). Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis selama 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol negatif, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT. Degradasi DDT dengan masing-masing bakteri tanpa jamur dijadikan sebagai kontrol positif. Jenis bakteri dengan kemampuan degradasi terbesar akan digunakan pada proses degradasi DDT selanjutnya (Ashari, 2013).

3.2.7. Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Kultur jamur hasil regenerasi di-preinkubasi pada 10 mL media PDB selama 7 hari pada suhu 30°C dan ditambah 50 µL DDT 5 mM dalam DMSO (konsentrasi akhir 0,25 µmol DDT/labu). Selanjutnya ditambahkan kultur bakteri (konsentrasi optimal) hasil preinkubasi (15 jam pada media NB) dengan variasi waktu penambahan 0, 1, 3 dan 5 hari setelah penambahan DDT. Tiap labu diberi oksigen dan ditutup sumbat kaca serta diselotip. Kultur diinkubasi secara statis hingga waktu inkubasi total mencapai 7 hari pada suhu 30°C. Sebagai kontrol, kultur dinonaktifkan dengan autoclave terlebih dahulu pada suhu 121°C selama 15 menit sebelum ditambah DDT dan tidak dilakukan penambahan bakteri (Ashari, 2013).

3.2.8. Perolehan Ulang (Recovery) DDT

Metanol sebanyak 20 mL dan 50 μ L piren 5 mM ditambahkan kedalam kultur hasil inkubasi. Sampel dicuci dengan 5mL aseton. Kultur disaring menggunakan filter 0,2 μ m dengan diameter 110 mm. Filtrat dievaporasi pada suhu 40°C hingga aseton dan metanol menguap semua. Filtrat yang tidak menguap dimasukkan kedalam corong pisah, lalu ditambahkan 50 mL aquades dan 50 mL *n*-heksana dan dikocok selama 10 menit. Fasa organik dipisahkan sedangkan fasa air diekstrak kembali sebanyak 2 kali. Fasa organik yang terkumpul dimasukkan kedalam erlenmeyer yang telah berisi Na₂SO₄ anhidrat, kemudian disaring. Sampel dievaporasi pada suhu 40°C hingga tersisa sekitar 1 mL. Sampel dianalisis menggunakan GC/MS. Sisa sampel dievaporasi kembali hingga kering dan ditambah 1 mL metanol. Residu (sampel) dihomogenkan dengan *ultrasonic cleaner*, kemudian dianalisis menggunakan HPLC (JASCO MD-1510) dengan komposisi fase gerak metanol:air = 82 : 18 (Purnomo dkk., 2010).

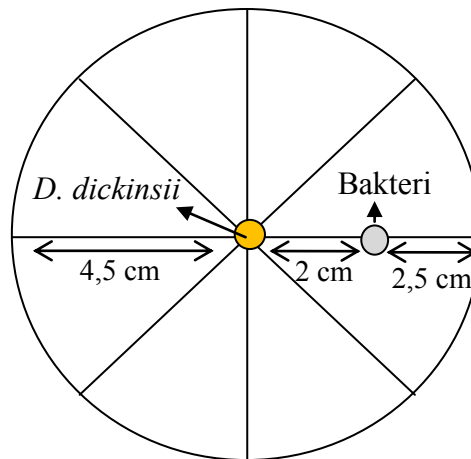
3.2.9. Identifikasi Metabolit Produk dan Jalur Degradasi

Dalam penelitian ini identifikasi metabolit produk dilakukan dengan cara menganalisa sampel hasil ekstraksi dengan menggunakan instrumentasi GC-MS (Agilent 7890A) dengan kondisi suhu inlet 250°C dan suhu oven dari 80-320°C dengan kecepatan perubahan suhu 2°C/menit menggunakan gas pembawa helium. Setelah metabolit produk dari hasil degradasi DDT diketahui data metabolit produk tersebut digunakan dalam menentukan jalur degradasi DDT (Purnomo dkk., 2010).

3.2.10. Analisis Interaksi *D. dickinsii* dengan bakteri

Analisis interaksi antara *D. dickinsii* dengan bakteri dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah penambahan bakteri mempengaruhi pertumbuhan jamur *D. dickinsii*. Analisa interaksi ini dilakukan dengan cara diambil 1 plug (9 mm diameter) miselium *D. dickinsii* yang telah dipre-inkubasi dan diinokulasikan ke dalam media PDA dalam cawan petri diameter 90 mm dengan posisi ditengah cawan petri. Selanjutnya bakteri yang telah di preinkubasi dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali pengulangan dan 10 μ L bakteri

diinokulasikan ke dalam petri dengan jarak 2 cm dari plug miselium *D. dickinsii*. Posisi kultur dikondisikan seperti pada Gambar 3.1. Masing-masing kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 25°C. Pengukuran miselium dilakukan setiap hari setelah mencapai masa inkubasi 3 hari. Sebagai kontrol kultur *D. dickinsi* ditanam tanpa adanya penambahan bakteri (Kamei dkk., 2011).



Gambar 3.1. Posisi kultur untuk analisa interaksi *D. dickinsii* dengan bakteri

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Regenerasi Mikroorganisme

Dalam penelitian ini, digunakan jamur *Daedalea dickinsii* sebagai mikroorganisme pendegradasi DDT utama dan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* serta *Ralstonia pickettii* sebagai mikroorganisme penunjang optimasi degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. *D. dickinsii* dipilih sebagai mikroorganisme pendegradasi DDT utama dikarenakan jamur tersebut telah dilaporkan memiliki kemampuan untuk mendegradasi DDT menggunakan reaksi Fenton, namun kemampuan *D. dickinsii* dalam mendegradasi DDT masih relatif rendah dan membutuhkan waktu yang lama yaitu sebanyak 47% selama 14 hari masa inkubasi. *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii* dipilih karena ketiga bakteri tersebut banyak dijumpai di lingkungan khususnya tanah, dimana DDT banyak terkontaminasi di tanah. Selain itu, ketiga bakteri tersebut juga pernah dilaporkan memiliki kemampuan untuk mendegradasi polutan organik. *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* pernah dilaporkan oleh Bidlan (2003) bahwa kedua bakteri tersebut memiliki kemampuan mendegradasi DDT menjadi beberapa metabolitnya yang lebih sederhana, sedangkan *R. pickettii* dilaporkan oleh Ryan dkk. (2006) bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri pendegradasi senyawa xenobiotik seperti toluena dan trikloroetilena.

Proses regenerasi mikroorganisme dalam penelitian ini bertujuan untuk mengaktifkan kembali jamur maupun bakteri yang akan digunakan dalam proses biodegradasi DDT. Regenerasi mikroorganisme ini perlu dilakukan karena sebelumnya jamur dan bakteri yang akan digunakan tersimpan sebagai stok dalam posisi nonaktif pada suhu rendah. Proses regenerasi jamur dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 cm (diameter) miselium jamur *D. dickinsii* ke dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Penanaman kultur dilakukan pada media agar PDA dikarenakan dalam media agar tersebut telah mengandung nutrien-nutrien penting yang dibutuhkan oleh jamur untuk tumbuh. Purnomo dkk. (2008) melaporkan bahwa kemampuan degradasi

DDT oleh *D. dickinsii* lebih optimal dilakukan pada media PDA/PDB dibandingkan dengan media *High Nitrogen* (HN) maupun media *Low Nitrogen* (LN). Di dalam PDA terdapat tiga komponen utama antara lain ekstrak kentang sebagai sumber karbohidrat dan mineral-mineral yang dibutuhkan oleh jamur, dekstrosa sebagai sumber karbon yang akan digunakan dalam metabolisme jamur untuk menghasilkan energi, dan protein sebagai sumber nitrogen yang akan digunakan untuk mensintesis asam amino dan protein oleh jamur (Djarajah, 2001). Suhu inkubasi dikondisikan pada suhu 30°C dikarenakan suhu tersebut merupakan suhu dimana jamur *D. dickinsii* dapat tumbuh secara optimal (Purnomo dkk., 2008).

Selain jamur, ketiga jenis bakteri yang akan digunakan dalam proses degradasi DDT juga perlu diregenerasi. Untuk regenerasi bakteri, masing masing jenis bakteri diambil 1 ose dan diinokulasikan kedalam media Nutrien agar (NA). Masing-masing kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Media NA dipilih sebagai media inokulasi karena memiliki kandungan nutrisi yang lengkap dan sesuai kebutuhan perkembangbiakan bakteri. Media NA mengandung ekstrak daging yang merupakan sumber karbohidrat dan vitamin bagi bakteri, pepton sebagai sumber nitrogen yang merupakan prekursor asam amino, protein dan enzim bagi bakteri, NaCl sebagai media pengatur tekanan osmosis pada bakteri agar nutrisi pada media dapat masuk ke dalam sel bakteri, serta agar yang berfungsi untuk memadatkan media (Thomas dkk., 2011). Suhu inkubasi bakteri dilakukan pada suhu 37°C dikarenakan suhu tersebut merupakan suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri (Todar, 2008).

Sebelum digunakan pada proses biodegradasi DDT, mikroorganisme yang akan digunakan dalam penelitian ini harus dipre-inkubasi terlebih dahulu. Pre-inkubasi ini dilakukan agar mikroorganisme dapat tumbuh beradaptasi terlebih dahulu terhadap media yang baru. Dengan adanya proses adaptasi tersebut mikroorganisme akan mulai tumbuh dan memproduksi metabolit dan enzim-enzim yang akan digunakan pada proses degradasi sehingga mikroorganisme tersebut siap untuk diaplikasikan dalam proses biodegradasi. Dalam proses pre-inkubasi jamur, 1 plug (diameter 1cm) miselium jamur diinokulasikan kedalam media PDB dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Media PDB dipilih

karena media tersebut merupakan media yang paling optimal bagi *D. dickinsii* untuk mendegradasi DDT dibandingkan dengan media LN maupun media HN (Purnomo dkk., 2008). Waktu pre-inkubasi dipilih selama 7 hari karena dalam jangka waktu tersebut miselium dari jamur *D. dickinsii* telah tumbuh dan siap untuk diaplikasikan dalam proses biodegradasi. Selain pada jamur, pre-inkubasi juga dilakukan pada ketiga bakteri yang akan digunakan sebagai penunjang biodegradasi. Dalam pre-inkubasi bakteri, 1 ose bakteri diinokulasikan kedalam media NB dan diinkubasi sesuai waktu fasa stasioner bakteri pada suhu 37°C. Waktu pre-inkubasi bakteri dipilih sampai bakteri mencapai fasa stasionernya dikarenakan pada fasa tersebut bakteri mulai berhenti berkembangbiak sehingga energinya lebih difokuskan untuk memproduksi metabolit sekunder sebagai upaya untuk mempertahankan diri. Dengan demikian pada fasa tersebut merupakan fase optimal dimana bakteri memproduksi metabolit sekunder dan enzim-enzim yang akan digunakan untuk meningkatkan kemampuan degradasi *D. dickinsii* (Ashari, 2013).

4.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

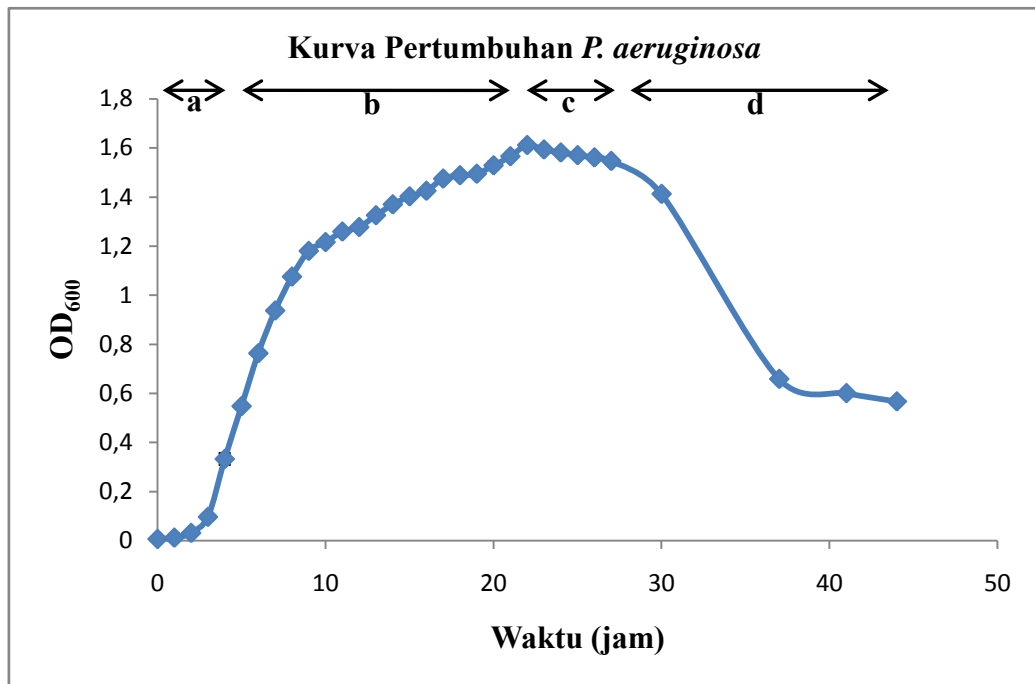
Kurva pertumbuhan bakteri merupakan kurva yang menunjukkan fase-fase pertumbuhan dari suatu bakteri. Fase-fase tersebut antara lain fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Keempat fase tersebut digambarkan dalam perbedaan periode tumbuh yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan kecepatan tumbuh pada kurva pertumbuhan bakteri. Fase lag merupakan fase awal pada pertumbuhan bakteri dimana pada fase tersebut kecepatan tumbuh bakteri masih nol. Hal tersebut dikarenakan pada fase lag merupakan fase dimana bakteri baru beradaptasi pada lingkungan media baru sehingga bakteri lebih fokus ke mempertahankan diri untuk tumbuh pada media baru tersebut dibandingkan untuk berkembang biak. Fase eksponensial merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan pesat. Peningkatan pertumbuhan sel bakteri seimbang dengan peningkatan jumlah sel pada setiap waktu. Fase ketiga yaitu fase stasioner dimana jumlah pertumbuhan sel sebanding dengan kematian sel sehingga kurva pertumbuhannya menjadi datar kembali. Hal tersebut dapat terjadi karena pada fase stasioner jumlah karbon, sumber energi serta nutrisi telah habis digunakan sehingga bakteri berusaha untuk

mempertahankan diri dengan memproduksi metabolit sekunder untuk membunuh sel mati bakteri yang lainnya. Fase terakhir yaitu fase kematian dimana mulai terjadi penurunan jumlah sel bakteri. Penurunan jumlah sel ini dapat terjadi akibat sel mati bakteri yang dimanfaatkan bakteri lain untuk tumbuh sehingga jumlah sel mati bakterinya mengalami pengurangan (Maier, 2009).

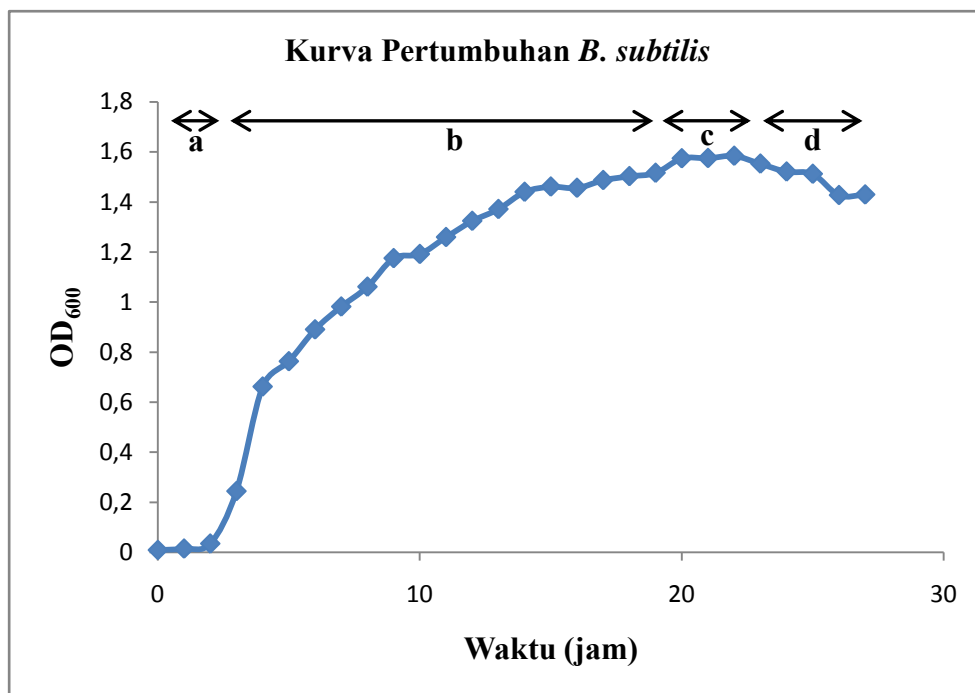
Dalam penelitian ini pembuatan kurva standar bakteri bertujuan untuk mencari waktu fasa stasioner dari setiap bakteri yang akan digunakan dalam degradasi DDT. Fasa stasioner tiap bakteri perlu dicari karena pada fase tersebut masing-masing bakteri memiliki kemampuan yang optimal untuk memproduksi metabolit sekunder yang mampu meningkatkan kemampuan degradasi DDT (Maier, 2009). Pembuatan kurva standar dalam penelitian ini dilakukan dengan metode turbidimetri pada *optical density* OD₆₀₀. Metode Turbidimetri merupakan metode pengukuran jumlah sel bakteri berdasarkan kekeruhan. Metode ini mengukur pengurangan intensitas cahaya pada spektrofotometer akibat adanya penghamburan cahaya oleh sel-sel bakteri yang ada pada kuvet. Adanya penghamburan cahaya tersebut mengakibatkan turunnya intensitas cahaya yang akan dinotasikan sebagai suatu nilai. Semakin besar nilai tersebut menunjukkan semakin banyak jumlah sel bakteri yang ada di dalam kuvet (Widdel, 2010). OD₆₀₀ menunjukkan bahwa pada penelitian ini digunakan cahaya pada panjang gelombang 600nm dalam pembuatan kurva pertumbuhan. Panjang gelombang 600 nm dipilih karena pada warna kultur bakteri dimana 540 nm digunakan untuk kultur yang berwarna kuning terang dan 600-625 nm digunakan untuk kultur yang berwarna kuning-coklat (Ashari, 2014).

Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara meregenerasi masing-masing bakteri kedalam 10 mL media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Regenerasi tersebut bertujuan untuk mengaktifkan kembali sel bakteri yang sebelumnya disimpan sebagai stok. Selanjutnya kultur hasil regenerasi masing-masing bakteri diambil sebanyak 1 mL dan diinokulasikan kedalam 480 mL media NB dan diinkubasi pada suhu 37°C sampai diperoleh fasa kematian bakteri. Selama masa inkubasi, absorbansi bakteri diukur setiap jamnya dengan spektrofotometer pada OD₆₀₀ untuk mengetahui fase pertumbuhan dari masing-masing bakteri. Dalam penelitian ini diperoleh data kurva pertumbuhan untuk

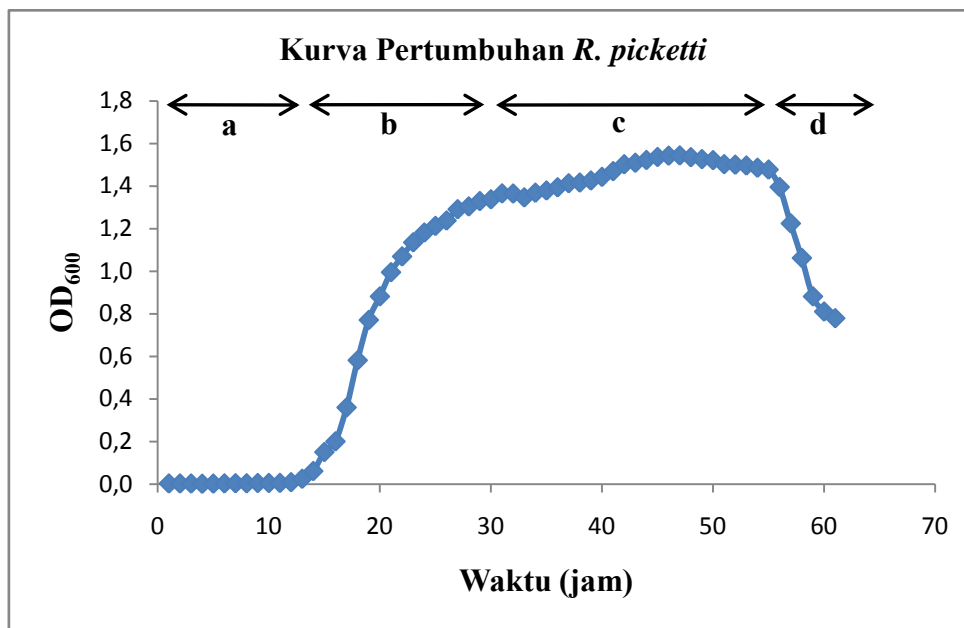
masing-masing bakteri *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. Pickettii* seperti pada Gambar 4.1., Gambar 4.2. dan Gambar 4.3.



Gambar 4.1. Kurva pertumbuhan *P. aeruginosa*. a. fase lag, b. fase eksponensial, c. fase stasioner, dan d. fase kematian



Gambar 4.2. Kurva pertumbuhan *B. subtilis*. a. fase lag, b. fase eksponensial, c. fase stasioner, dan d. fase kematian



Gambar 4.3. Kurva pertumbuhan *R. pickettii*. a. fase lag, b. fase eksponensial, c. fase stasioner, dan d. fase kematian

Berdasarkan kurva pertumbuhan di atas dapat diketahui bahwa masing-masing spesies bakteri memiliki periode fase yang berbeda-beda. Bakteri *P. aeruginosa* mengalami fase lag pada jam ke 0-3, fase eksponensial pada jam ke 3-20, fase stasioner 20-26 dan fase kematian dimulai pada jam ke-26. Bakteri *B. subtilis* mengalami fase lag pada jam ke 0-3, fase eksponensial pada jam ke 3-19, fase stasioner 19-23 dan fase kematian dimulai pada jam ke-23. Sedangkan, bakteri *R. pickettii* mengalami fase lag pada jam ke 0-14, fase eksponensial pada jam ke 14-29, fase stasioner 29-54 dan fase kematian dimulai pada jam ke-54. Dari data tersebut diketahui bahwa fase stasioner untuk *P. aeruginosa* ada pada jam ke 21 dengan absorbansi 1,56, *B. subtilis* pada jam ke 20 dengan absorbansi 1,57, sedangkan *R. pickettii* pada jam ke 30 dengan absorbansi 1,37. Waktu-waktu fase stasioner tersebut selanjutnya akan dijadikan acuan sebagai lamanya waktu pre-inkubasi masing-masing bakteri sebelum diaplikasikan pada degradasi DDT. Waktu stasioner tersebut dipilih karena pada fase stasioner tersebut merupakan fase optimal dimana masing-masing bakteri mampu memproduksi metabolit sekunder yang dapat meningkatkan kemampuan degradasi DDT (Ashari, 2013). Pada setiap waktu stasioner tersebut besarnya absorbansi dapat mewakili banyaknya sel bakteri dalam setiap mL kulturnya. Untuk bakteri *P. aeruginosa* 1

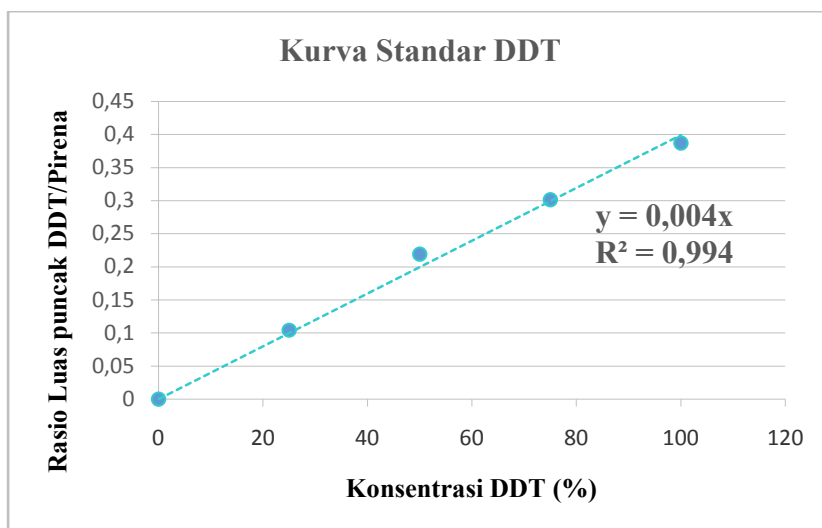
mL setara dengan $1,05 \times 10^9$ CFU. Pada bakteri *B. subtilis* 1 mL setara dengan $6,7 \times 10^8$ CFU, sedangkan pada bakteri *R. pickettii* 1 mL setara dengan $1,44 \times 10^{13}$ CFU.

4.3. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar atau kurva kalibrasi merupakan kurva yang digunakan untuk menentukan hubungan antara respon analitik dengan konsentrasi suatu analat. Hubungan antara respon analitik dengan konsentrasi analat tersebut ditentukan dengan menggunakan zat/senyawa standar yang murni atau telah diketahui konsentrasinya. Kurva standar / kurva kalibrasi dibuat dengan memplot kurva dengan respon analitik pada sumbu y dan konsentrasi analat yang telah diketahui pada sumbu x. Dari kurva yang telah dibuat tersebut nantinya akan diperoleh persamaan kalibrasi yang dapat digunakan dalam menentukan konsentrasi senyawa yang akan kita cari (Skoog, 2013). Dalam penelitian ini kurva standar dibuat sebagai acuan untuk menentukan konsentrasi DDT dan metabolit produk hasil degradasi. Kurva standar dalam penelitian ini dibuat dengan metode standar internal dimana pirena digunakan sebagai standar internal. Pirena dipilih sebagai standar internal karena memiliki sifat fisik yang hampir sama dengan DDT dan metabolit produknya (Purnomo dkk., 2008).

Kurva standar dibuat dengan membuat larutan DDT dengan variasi konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25% dan 0% (100% = $0,25 \mu\text{mol}$ DDT yang berasal dari DDT 5 mM) yang selanjutnya dicampur dengan 50 μL Pirena 5 mM sebagai standar internal dan diidentifikasi dengan menggunakan HPLC. Dari pengukuran dengan menggunakan HPLC diperoleh data luas puncak DDT dan pirena yang selanjutnya dibuat rasio DDT/Pirena dan diplot pada sumbu y kurva, sedangkan untuk variasi konsentrasi DDT yang telah di buat di plot pada sumbu x kurva sehingga diperoleh kurva standar DDT seperti pada Gambar 4.4. (Data luas puncak DDT dan pirena terlampir (Lampiran 3)). Dari kurva standar tersebut diperoleh persamaan kalibrasi $y=0,004x$ dimana, y merupakan rasio luas puncak DDT/Pirena sedangkan x merupakan konsentrasi DDT. Persamaan tersebut yang selanjutnya akan dijadikan acuan untuk menentukan konsentrasi *recovery* DDT dari hasil proses degradasi. Selain persamaan kalibrasi, dari data kurva standar juga dapat diperoleh nilai koefisien korelasi kurva standar. Nilai koefisien

korelasi tersebut menunjukkan adanya hubungan linieritas antara konsentrasi DDT dengan Rasio luas puncak DDT/Pirena. Dari kurva standar pada Gambar 4.4. diperoleh nilai koefisien korelasi 0,994 yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan linieritas yang hampir sempurna antara konsentrasi DDT dengan rasio luas puncak DDT/pirena. Hal tersebut dikarenakan besarnya nilai koefisien korelasinya mendekati 1.



Gambar 4.4. Kurva standar DDT

4.4. Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsi*

Dalam penelitian ini degradasi DDT oleh *D. dickinsii* dilakukan dengan menambahkan 50 μ L DDT 5 mM (dalam DMSO konsentrasi akhir: 0,25 μ mol DDT/labu) kedalam kultur *D. dickinsii* hasil pre-inkubasi. DMSO digunakan sebagai pelarut DDT dikarenakan DMSO merupakan pelarut aprotik yang dapat melarutkan DDT yang merupakan senyawa non polar ke dalam media PDB yang bersifat polar. Pemberian oksigen bertujuan untuk menyuplai oksigen untuk jamur *D. dickinsii* agar metabolismenya berjalan lancar. Hal tersebut dikarenakan *D. dickinsii* merupakan jamur dengan metabolisme aerobik yang membutuhkan oksigen untuk proses metabolismenya. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C dikarenakan pada suhu tersebut jamur *D. dickinsii* dapat tumbuh secara optimal (Purnomo dkk., 2008).

Setelah proses degradasi berlangsung, dilakukan pengekstrakan kembali DDT dari kultur hasil proses degradasi. Pengekstrakan kembali DDT tersebut bertujuan untuk mengetahui kadar DDT yang tersisa (*recovery*) dari proses

biodegradasi sehingga dapat diketahui kemampuan biodegradasi dari mikroorganisme yang digunakan. Pengestrakkan kembali DDT diawali dengan menambahkan 20 mL Metanol dan 50 μ L piren 5 mM ke dalam kultur hasil inkubasi. Penambahan metanol bertujuan untuk menghentikan reaksi metabolisme mikroorganisme. Hal tersebut dikarenakan metanol memiliki sifat desinfektan sehingga dapat membunuh mikroorganisme pendegradasi dan merusak enzim-enzim sehingga reaksi enzimatik berhenti. Penambahan pirena bertujuan sebagai standar internal untuk mengantisipasi hilangnya DDT akibat proses pengekstrakan (Skoog, 2013). Selanjutnya sampel dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge dan erlemeyer bekas sampel dicuci dengan 5 mL aseton. Pencucian dengan aseton bertujuan untuk membersihkan erlemeyer dari sisa-sisa larutan sampel. Larutan sampel yang telah dipindah ke tabung sentrifuge kemudian dihomogenkan dengan homogenizer untuk memecah miselium dan membebaskan DDT yang terjebak dalam miselium jamur. Sampel yang telah homogen selanjutnya dipisahkan dengan sentrifuge dan disaring dengan tujuan untuk memisahkan biomassa jamur dari sampel.

Setelah melalui penyaringan, filtrat yang dihasilkan dievaporasi pada suhu 40°C untuk menguapkan aseton dan metanol pada sampel. Filtrat yang tidak menguap dimasukkan ke dalam corong pisah, dan diekstrak dengan menggunakan 100 mL *n*-heksana sebanyak 2 kali pengekstrakan. Pengekstrakan dilakukan dengan menggunakan pelarut *n*-heksana yang bersifat nonpolar karena DDT dalam sampel yang akan diekstrak juga bersifat nonpolar sehingga nantinya DDT dalam sampel akan terekstrak ke dalam *n*-heksana. Fasa organik yang terkumpul selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan bubuk Na₂SO₄ anhidrat, kemudian disaring. Penambahan bubuk Na₂SO₄ anhidrat bertujuan untuk mengikat air yang tertinggal dalam sampel hasil ekstrak. Filtrat hasil penyaringan selanjutnya dievaporasi pada suhu 40°C hingga tersisa sekitar 1 mL. Evaporasi bertujuan untuk menguapkan pelarut dan memekatkan sampel sehingga nantinya dapat memberikan puncak kromatogram yang jelas. Sampel dianalisis menggunakan GC/MS. Sisa sampel dievaporasi kembali hingga kering dan ditambah 1 mL metanol. Residu (sampel) dihomogenkan dengan ultrasonic cleaner, kemudian dianalisis menggunakan HPLC. Pelarut metanol digunakan

karenakan dalam analisa HPLC digunakan kolom nonpolar sehingga sampel yang akan dianalisa harus dilarutkan dalam pelarut polar agar tidak merusak kolom HPLC (Purnomo dkk., 2010).

Tabel 4.1. Data analisa HPLC hasil degradasi DDT oleh *D. dickinsii*.

Sampel	Luas Puncak DDT	Luas Puncak Pirena	Luas Puncak DDT/ Luas Puncak Pirena	% Recovery
Kontrol	75547,93	29219,51	0,39	96,70
Perlakuan	7930,74	1367,33	0,17	43,09

Dari data hasil analisa HPLC diperoleh data luas puncak DDT dan luas puncak pirena seperti pada Tabel 4.1. Dari data luas puncak tersebut dapat diketahui rasio luas puncak DDT/Pirena yang selanjutnya disubstitusikan dalam persamaan yang diperoleh dari kurva standar ($y=0,004x$) dan dihitung nilai x nya sebagai konsentrasi DDT hasil degradasi. Dari data pada Tabel 4.1. diperoleh % recovery kontrol sebesar 96,70 % dan % recovery untuk degradasi dengan menggunakan *D. dickinsii* selama 7 hari masa inkubasi sebesar 43,09 %. Dengan demikian besarnya kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii* selama 7 hari masa inkubasi dapat dihitung dengan mengurangi % recovery kontrol dengan % recovery *D. dickinsii* dan diperoleh % degradasi sebesar 53,61%. Purnomo dkk. (2008) melaporkan bahwa *D. dickinsii* mampu mendegradasi DDT sebesar 47% dalam media PDB selama 14 hari dalam media PDB. Walaupun menggunakan waktu inkubasi yang lebih lama, hasil tersebut lebih rendah dibandingkan hasil pada penelitian ini yaitu 53,61% dengan waktu inkubasi hanya 7 hari. Perbedaan hasil tersebut dapat dikarenakan pada penelitian sebelumnya menggunakan volume total kultur dua kali lebih rendah dibandingkan pada penelitian ini sehingga konsentrasi DDT pada kultur lebih pekat dan toksisitasnya lebih tinggi. Kemampuan *D. dickinsii* dalam mendegradasi DDT tersebut melibatkan hidroksi radikal yang dihasilkan oleh reaksi Fenton dalam metabolisme jamur *D. dickinsii*. Seperti pada jamur pelapuk coklat pada umumnya *D. dickinsii* mampu memproduksi hidroksi radikal melalui reaksi Fenton untuk mendegradasi kayu dan lignoselulosa sebagai sumber makanannya (Kaneko dkk., 2005).

4.5. Biodegradasi DDT oleh Bakteri

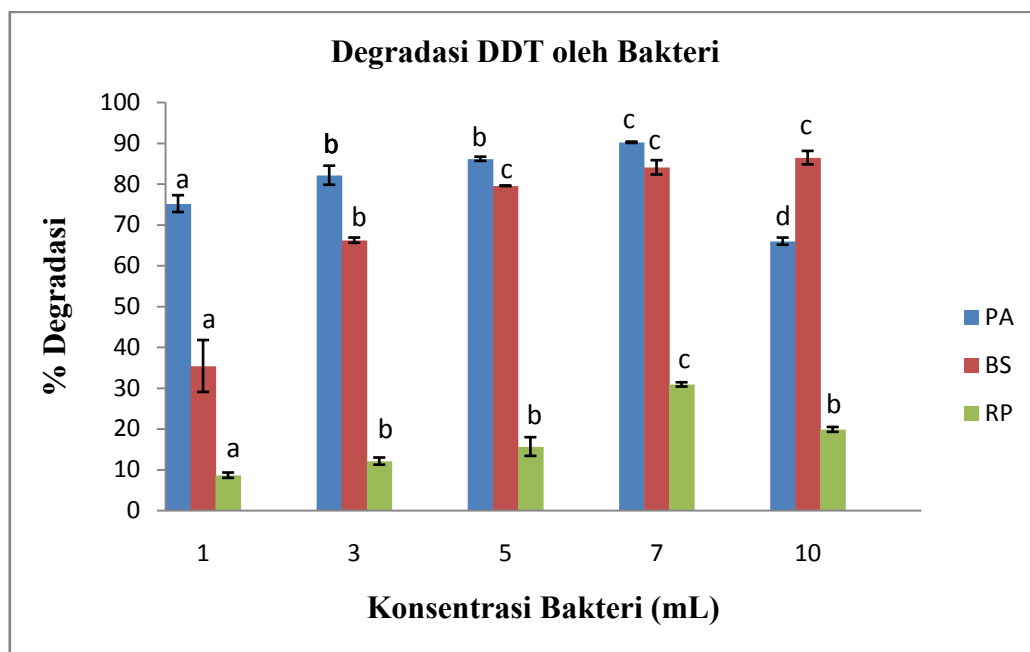
Dalam penelitian ini kemampuan masing-masing bakteri yang akan digunakan dalam optimalisasi degradasi DDT oleh *D. dickinsii* juga diteliti. Kemampuan degradasi DDT oleh masing-masing bakteri juga diteliti dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan awal masing-masing bakteri dalam mendegradasi DDT sebelum dilakukan pencampuran dengan *D. dickinsii*. Biodegradasi DDT oleh masing-masing bakteri ini dilakukan dengan menambahkan 50 μ L DDT 5 mM (dalam DMSO konsentrasi akhir: 0,25 μ mol DDT/labu) ke dalam kultur bakteri (Variasi konsentrasi : 1, 3 ,5 ,7 dan 10 mL) hasil pre-inkubasi. Pada degradasi DDT dengan menggunakan masing-masing bakteri ini dilakukan dengan media dan kondisi yang sama dengan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui apakah masing-masing bakteri tersebut dapat hidup dan mendegradasi DDT dengan kondisi optimal *D. dickinsii*. Hal tersebut diperlukan karena nantinya masing-masing bakteri tersebut akan ditumbuhkan bersama dengan *D. dickinsii* untuk mendegradasi DDT sehingga bakteri yang digunakan harus bisa tumbuh sesuai dengan kondisi media optimal pada *D. dickinsii* (Ashari, 2013).

Setelah masa inkubasi bakteri untuk degradasi DDT selama 7 hari berakhir, dilakukan pengestrakan pada masing-masing kultur untuk mendapatkan kembali DDT hasil degradasi. Pengestrakan dilakukan dengan cara yang sama dengan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. Dari data analisa menggunakan HPLC diperoleh data persen degradasi seperti pada Tabel 4.2. dan diplotkan dalam grafik diperoleh data seperti pada Gambar 4.5.

Tabel 4.2. Persen Degradasi DDT oleh Bakteri

Konsentrasi Bakteri (mL)	% Degradasi		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. pickettii</i>
1	75,17 \pm 2,06 ^a	35,38 \pm 6,36 ^a	8,62 \pm 0,65 ^a
3	82,13 \pm 2,34 ^b	66,21 \pm 0,64 ^b	12,08 \pm 0,88 ^b
5	86,15 \pm 0,51 ^b	79,51 \pm 0,04 ^c	15,64 \pm 2,29 ^b
7	90,20 \pm 0,16 ^c	84,06 \pm 1,76 ^c	30,87 \pm 0,52 ^c
10	65,98 \pm 0,87 ^d	86,44 \pm 1,64 ^c	19,84 \pm 0,60 ^b

* Perbedaan alfabet pada data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil uji t dengan n=2 dan $\alpha=0,05$.



Gambar 4.5. Persen Degradasi DDT oleh Bakteri. PA= *P. aeruginosa*, BS = *B. subtilis* dan RP = *R. pickettii*. Perbedaan alfabet pada data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil uji t dengan $n=2$ dan $\alpha=0,05$.

Berdasarkan Tabel 4.2. dan Gambar 4.5., persen degradasi DDT terbesar untuk bakteri *P. aeruginosa* ada pada konsentrasi bakteri 7 mL ($1 \text{ mL} = 1,05 \times 10^9$ CFU) yaitu mencapai 90,2%. Bakteri *B. subtilis* diperoleh persen degradasi terbesar ada pada konsentrasi bakteri 10mL ($1 \text{ mL} = 6,7 \times 10^8$ CFU) yaitu sebesar 86,44%, sedangkan untuk bakteri *R. pickettii* persen degradasi terbesar ada pada konsentrasi bakteri 7 mL ($1 \text{ mL} = 1,44 \times 10^{13}$ CFU) yaitu sebesar 30,87%. Dari data tersebut secara umum kemampuan degradasi bakteri mendegradasi DDT tidak linier terhadap konsentrasasi bakteri yang digunakan. Secara umum persen degradasi mengalami peningkatan dari konsentrasi bakteri 1-7 mL, namun ketika konsentrasi bakteri 10 mL, persen degradasi untuk *B. subtilis* mengalami peningkatan sangat sedikit, sedangkan untuk bakteri *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* mengalami penurunan. Walaupun pada bakteri *B. subtilis* pada konsentrasi 7mL ke 10 mL mengalami peningkatan, akan tetapi tidak berbeda secara signifikan (Tabel 4.2). Hal tersebut didukung oleh hasil Uji T yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara persen degradasi pada konsentrasi 7 mL dan 10 mL untuk bakteri *B. subtilis*. Dengan demikian dari ketiga bakteri

tersebut dapat diketahui bahwa setelah konsentrasi 7 mL kemampuan degradasinya semakin melemah. Hal tersebut dapat dikarenakan pada konsentrasi bakteri yang lebih pekat maka jumlah bakterinya semakin banyak dan tingkat persaingan antar bakteri untuk mempertahankan diri juga lebih tinggi sehingga bakteri lebih cenderung untuk memproduksi metabolit sekunder untuk mempertahankan dirinya. Hal tersebut mengakibatkan menurunnya kemampuan degradasi dari tiap bakteri (Maier, 2009).

Kemampuan ketiga jenis bakteri tersebut dalam mendegradasi DDT berkaitan dengan kemampuan dari ketiga jenis bakteri tersebut dalam memproduksi enzim pendegradasi dalam proses metabolismenya. Jeon dan Kim (2015) menjelaskan bahwa bakteri jenis *P. aeruginosa* mampu menghasilkan enzim-enzim hidroksilase seperti alkalin monooksigenase dan Rubredoksin reduktase yang berperan dalam proses biodegradasi. Jones dkk. (2012) menjelaskan bahwa bakteri jenis *B. subtilis* mampu menghasilkan enzim Xilanase yang mampu mendegradasi hemiselulosa menjadi monomer-monomernya berupa xylan. Riyan dkk. (2007) menjelaskan bahwa bakteri jenis *R. pickettii* mampu menghasilkan enzim hidroksilase berupa 2,4,6-trichlorophenol-4-dechlorinase yang berperan dalam degradasi polutan terklorinasi berupa triklorofenol. Selain memiliki kemampuan menghasilkan enzim pendegradasi, ketiga jenis bakteri tersebut juga mampu menghasilkan biosurfaktan yang juga berperan dalam proses biodegradasi. Scheibenbogen dkk. (1994) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* mampu menghasilkan biosurfaktan jenis rhamnolipid. Banat dkk. (2010) juga melaporkan bahwa bakteri jenis *B. subtilis* mampu menghasilkan biosurfaktan berupa surfaktin (lipopeptida). Plaza dkk. (2005) juga melaporkan bahwa bakteri jenis *R. pickettii* juga memiliki kemampuan untuk memproduksi biosurfaktan yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kemampuan bioremediasi terhadap tanah yang terkontaminasi petroleum hidrokarbon.

4.6. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*

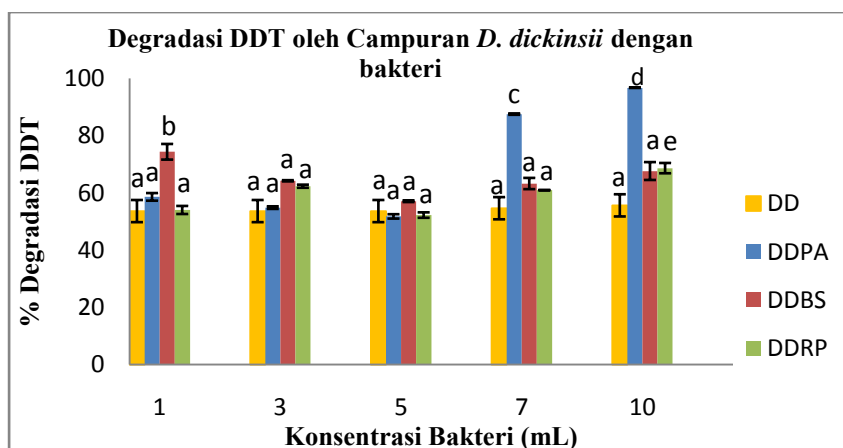
Seleksi bakteri dilakukan dengan cara melakukan degradasi DDT dengan menggabungkan *D. dickinsii* dengan ketiga jenis bakteri dalam beberapa variasi konsentrasi bakteri (1, 3, 5, 7, dan 10 mL). Kondisi dan media degradasi di

sesuaikan dengan kondisi dan media degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. Hal tersebut dikarenakan dalam penelitian ini tujuannya adalah untuk mengoptimalkan kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii* sehingga untuk media dan kondisi degradasinya harus disesuaikan dengan media dan kondisi degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. Dalam penelitian ini juga dilakukan variasi konsentrasi bakteri yang akan ditambahkan pada kultur *D. dickinsii*. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui pengaruh masing-masing konsentrasi bakteri terhadap kemampuan degradasi DDT oleh campuran kultur *D. dickinsii* dengan masing-masing bakteri. Dari hasil analisa dengan menggunakan HPLC diperoleh % degradasi DDT seperti pada tabel 4.3. dan Gambar 4.6.

Tabel 4.3. Data persen degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan bakteri

Konsentrasi Bakteri (mL)	% Degradasi		
	DD-PA	DD-BS	DD-RP
(<i>D. dickinsii</i>)	53,61 ± 3,88 ^a		
1	58,57 ± 1,33 ^a	74,33 ± 2,73 ^b	53,99 ± 1,41 ^a
3	54,82 ± 0,45 ^a	64,20 ± 0,21 ^a	62,30 ± 0,54 ^a
5	51,74 ± 0,77 ^a	57,06 ± 0,30 ^a	52,21 ± 0,95 ^a
7	87,51 ± 0,24 ^c	63,24 ± 1,96 ^a	60,93 ± 0,04 ^a
10	100 ± 0,00 ^d	67,60 ± 3,13 ^a	68,62 ± 1,80 ^e

* DD = *D. dickinsii*, PA = *P. aeruginosa*, BS = *B. subtilis*. Perbedaan alfabet pada data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil uji t dengan n=2 dan $\alpha=0,05$.



Gambar 4.6. Persen degradasi DDT oleh Campuran *D. dickinsii* dengan bakteri. DD = *D. dickinsii*, PA = *P. aeruginosa*, BS = *B. subtilis*. Perbedaan alfabet pada data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil uji t dengan n=2 dan $\alpha=0,05$.

Berdasarkan pada Tabel 4.3. dan gambar 4.6., pada penambahan bakteri *P. aeruginosa* terjadi peningkatan yang signifikan pada konsentrasi penambahan bakteri 7 dan 10 mL. Pada penambahan *P. aeruginosa* 7 mL pada kultur *D. dickinsii*, terjadi peningkatan persen degradasi dari 53,61% (tanpa penambahan bakteri) menjadi 87,51%, sedangkan untuk penambahan 10 mL mampu meningkatkan persen degradasi dari 53,61% (tanpa penambahan bakteri) menjadi 100%. Pada bakteri *B. subtilis* peningkatan degradasi yang signifikan terjadi pada konsentrasi penambahan bakteri 1 mL dimana mampu meningkatkan persen degradasi dari 53,61% (tanpa penambahan bakteri) menjadi 74,33%. Di sisi lain, bakteri *R. pickettii* dapat meningkatkan persen degradasi DDT secara signifikan ada pada konsentrasi penambahan bakteri 10mL dimana mampu meningkatkan persen degradasi dari 53,61% (tanpa penambahan bakteri) menjadi 68,62%. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa dengan penambahan bakteri mampu meningkatkan kemampuan degradasi *D. dickinsii*. Dalam penelitian terdahulu Wang dkk. (2010) dan Zang dkk. (2009, 2010) melaporkan bahwa dengan adanya penambahan bakteri mampu meningkatkan kemampuan jamur dalam mendegradasi polutan aromatik seperti pewarna dan PAH (*Polysyclic Aromatic Hydrocarbon*).

Kemampuan ketiga jenis bakteri tersebut dalam meningkatkan dengradasi DDT oleh *D. dickinsii* dapat disebabkan oleh kemampuan dari masing-masing bakteri tersebut untuk memproduksi biosurfaktan. Biosurfaktan yang dihasilkan dapat meningkatkan kelarutan DDT pada media sehingga DDT dapat lebih terdegradasi. Mulligan dkk. (2001) menjelaskan bahwa dengan adanya surfaktan mampu meningkatkan kemampuan remediasi tanah yang terkontaminasi polutan organik. Scheibenbogen dkk. (1994) melaporkan bahwa *P. aeruginosa* mampu menghasilkan biosurfaktan jenis rhamnolipid yang juga dapat diaplikasikan dalam peningkatan degradasi polutan hidrokarbon pada tanah. Banat dkk. (2010) juga melaporkan bahwa bakteri jenis *B. subtilis* mampu menghasilkan biosurfaktan berupa surfaktin (lipopeptida) yang dapat diaplikasikan dalam bidang biodegradasi maupun medis. Soudmand dkk. (2007) menjelaskan bahwa biosurfaktan dari *B. subtilis* mampu meningkatkan kemampuan degradasi limbah minyak. Plaza dkk. (2005) juga melaporkan bahwa bakteri jenis *R. pickettii* juga memiliki kemampuan untuk memproduksi biosurfaktan yang dapat dimanfaatkan

untuk meningkatkan kemampuan bioremediasi terhadap tanah yang terkontaminasi petroleum hidrokarbon.

Pada penambahan bakteri *B. subtilis*, peningkatan degradasi yang signifikan terjadi pada penambahan 1 mL bakteri *B. subtilis*. Namun, ketika konsentrasi penambahan bakterinya ditingkatkan maka peningkatan kemampuan degradasinya jadi menurun. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan biosurfaktan yang dihasilkan oleh *B. subtilis* merupakan biosurfaktan surfaktin (lipopeptida) yang juga memiliki kemampuan antibiotik sehingga semakin banyak *B. subtilis* yang ditambahkan maka biosurfaktan yang dihasilkan juga semakin banyak dan dapat meracuni bakteri maupun jamur yang digunakan (Arima dkk., 1968). Pada penelitian ini, penambahan 10 mL bakteri *P. aeruginosa* mampu memberikan peningkatan % degradasi tertinggi sehingga kultur *D. dickinsii* dengan penambahan 10 mL bakteri *P. aeruginosa* dipilih sebagai kombinasi terbaik dan digunakan dalam penelitian selanjutnya.

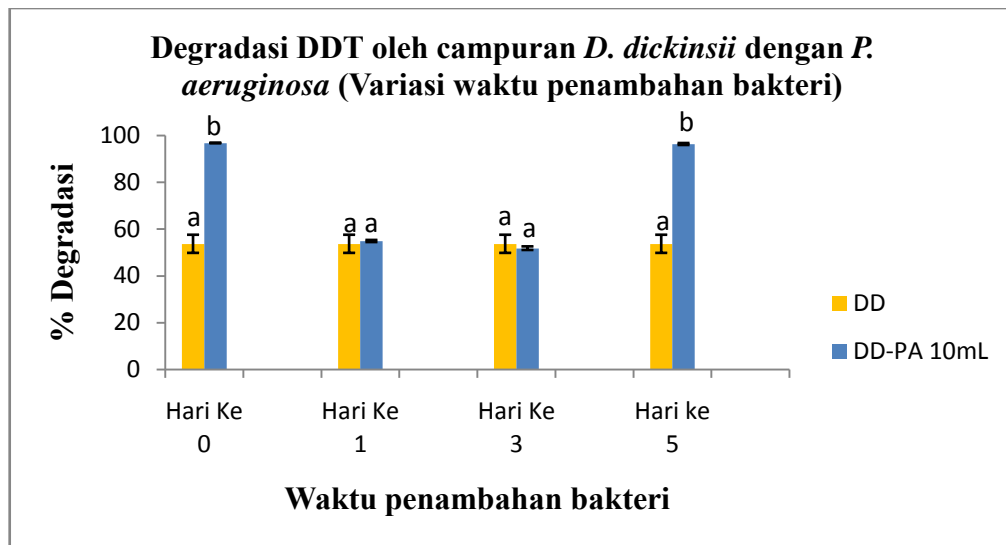
4.7. Pengaruh Waktu Penambahan Bakteri terhadap Biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Dalam penelitian ini juga dilakukan optimasi dengan mencari waktu penambahan bakteri yang tepat untuk mengoptimalkan biodegradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan bakteri. Dalam percobaan ini bakteri jenis *P. aeruginosa* dengan konsentrasi 10 mL diinokulasikan pada kultur *D. dickinsii* dengan variasi waktu 0, 1, 3, dan 5 hari setelah penambahan DDT kedalam kultur *D. dickinsii*. Variasi waktu dibatasi sampai hari ke 5 dikarena pada hari 7 merupakan masa panen kultur sehingga tidak memungkinkan dilakukan penambahan bakteri pada hari ke 7. Setelah masa inkubasi selama 7 hari setelah penambahan DDT, masing-masing kultur ditambah dengan pirena sebagai internal standar dan dilanjutkan dengan proses pengekstrakan untuk memperoleh kembali DDT hasil degradasi. Pengekstrakan dilakukan sesuai dengan metode pengekstrakan pada degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. Hasil ekstrak yang terkumpul kemudian dianalisa dengan HPLC untuk mengetahui kadar DDT hasil proses degradasi. Dari hasil analisa HPLC diperoleh data persen degradasi DDT seperti pada tabel 4.4 dan gambar 4.7.

Tabel 4.4. Data Persen degradasi DDT oleh DD-PA 10mL variasi waktu penambahan bakteri.

Sampel	% Recovery	% Degradasi	SD
Kontrol	96,70	0,00	0,38
DD	43,09	53,61	3,88
Hari Ke 0	0,00	100	0,00
Hari Ke 1	41,88	54,82	0,45
Hari Ke 3	44,95	51,75	0,77
Hari ke 5	0,43	96,27	0,42

* DD = *D. dickinsii*



Gambar 4.7. Degradasi DDT oleh Campuran *D. dickinsii* dan *P. aeruginosa* (Variasi waktu penambahan bakteri). DD = *D. dickinsii*, PA = *P. aeruginosa*. Perbedaan alfabet pada data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil uji t dengan $n=2$ dan $\alpha=0,05$.

Berdasarkan tabel 4.4 dan Gambar 4.7. dapat diketahui bahwa untuk variasi waktu penambahan bakteri peningkatan degradasi yang signifikan ada pada waktu penambahan bakteri hari ke 0 dan hari ke 5 setelah penambahan DDT. Peningkatan degradasi yang signifikan pada penambahan bakteri hari ke 0 dapat terjadi karena pada penambahan bakteri hari ke 0 jamur *D. dickinsii*, bakteri *P. aeruginosa* dan DDT langsung dicampurkan secara bersamaan sehingga baik *D. dickinsii* maupun *P. aeruginosa* dapat langsung beradaptasi terhadap toksisitas DDT secara bersamaan dan dapat langsung mendegradasinya secara bersamaan. Pada waktu penambahan bakteri hari ke 1 dan 3 tidak terjadi peningkatan kemampuan degradasi hal tersebut dapat dikarenakan pada penambahan hari ke 1

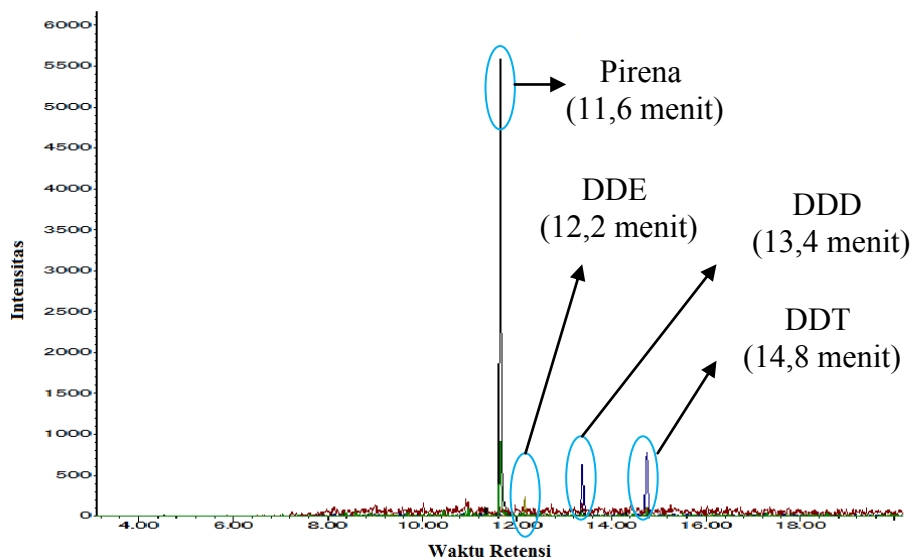
dan 3, bakteri *P. aeruginosa* baru ditambahkan setelah jamur *D. dickinsii* terlebih dahulu kontak dan beradaptasi dengan DDT. Hal tersebut dapat mengakibatkan *D. dickinsii* memproduksi metabolit sekunder untuk mempertahankan hidupnya, sehingga ketika ditambahkan bakteri, bakteri tersebut dapat teracuni oleh metabolit sekunder yang dihasilkan *D. dickinsii* untuk mempertahankan diri terhadap DDT. Hal tersebut dapat mengakibatkan tidak adanya peningkatan kemampuan degradasi pada penambahan bakteri hari ke 1 dan 3. Bae dan Min (2000) melaporkan bahwa jamur jenis *D. dickinsii* mampu menghasilkan metabolit sekunder golongan triterpenoid yang memiliki aktivitas antimikrobal. Pada waktu penambahan bakteri hari ke 5 kembali terjadi peningkatan kemampuan degradasi DDT yang signifikan. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan pada hari ke 5 DDT telah mengalami kontak dengan *D. dickinsii* dengan waktu yang cukup lama sehingga memungkinkan sebagian DDT telah mengalami degradasi dan toksisitasnya semakin menurun sehingga metabolit sekunder yang dihasilkan *D. dickinsii* juga menurun. Penurunan toksisitas tersebut memungkinkan untuk *P. aeruginosa* yang baru ditambahkan untuk tumbuh dan ikut mendegradasi DDT sehingga kembali terjadi peningkatan kemampuan degradasi. Dari hasil variasi waktu penambahan bakteri diperoleh waktu penambahan bakteri yang mampu menghasilkan peningkatan kemampuan degradasi paling maksimal adalah waktu penambahan bakteri saat hari ke 0.

4.8. Identifikasi Metabolit Produk dan Prakiraan Jalur Degradasi

Dalam penelitian ini juga dilakukan analisa metabolit produk dari hasil proses biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii*, *P. aeruginosa* dan campuran dari keduanya. Analisa metabolit produk tersebut bertujuan untuk mengetahui senyawa apa yang dihasilkan dari proses biodegradasi tersebut. Analisis metabolit produk dalam penelitian ini dilakukan dengan cara menganalisa sample hasil ekstraksi dengan menggunakan instrumentasi GC-MS. Instrumen GC-MS dipilih karena dengan menggunakan instrumen GC mampu memisahkan metabolit-metabolit produk dalam sampel yang selanjutnya dengan bantuan detektor MS masing-masing metabolit yang telah terpisahkan akan ditembak elektron dan terfragmentasi untuk mengetahui perkiraan senyawanya (Skoog, 2013). Dari hasil analisa dengan menggunakan GC-MS tersebut diperoleh hasil sebagai berikut :

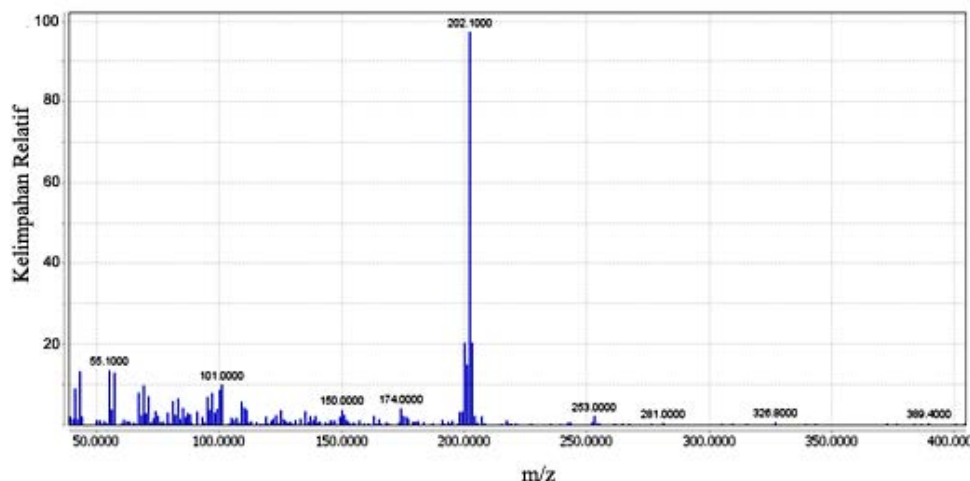
4.8.1. Metabolit Produk Degradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Dari hasil analisa GC-MS untuk sampel hasil degradasi DDT oleh jamur *D. dickinsii* diperoleh kromatogram GC seperti pada Gambar 4.8. Pada kromatogram tersebut muncul 4 puncak antara lain pirena pada waktu retensi 11,6 menit, DDE pada waktu retensi 12,2 menit, DDD pada waktu retensi 13,4 menit dan DDT pada waktu retensi 14,8 menit. Penentuan puncak-puncak tersebut didasarkan pada kecocokan antara spektrum MS pada waktu retensi yang muncul tersebut dengan spektrum MS dari database.

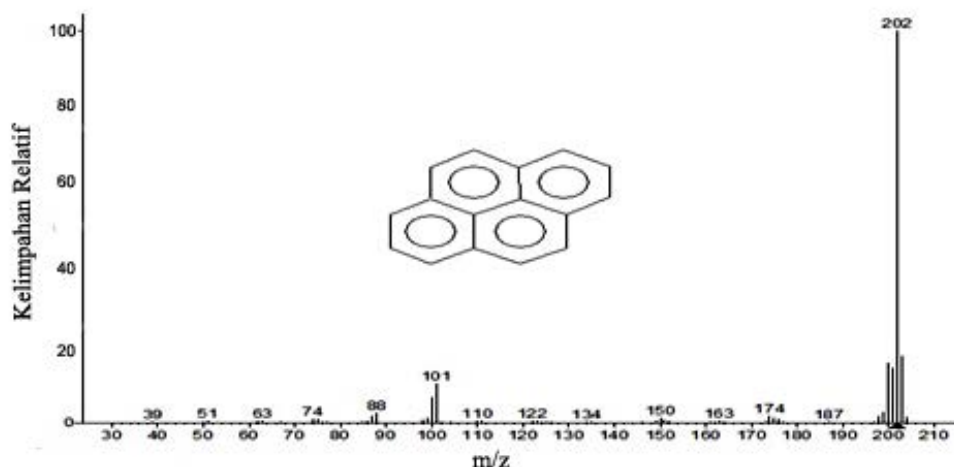


Gambar 4.8. Kromatogram GC-MS sampel degradasi DDT oleh *D. dickinsii*

Pada waktu retensi 11,6 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.9. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul pirena seperti yang ada pada Gambar 4.10. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 202 yang merupakan nilai M^+ dari molekul pirena. Selain itu dari kedua spektrum tersebut sama sama memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 202 (*base peak*), 174, 150 dan 101. Puncak-puncak pada m/z yang sama tersebut merupakan puncak-puncak hasil pemecahan (fragmentasi) molekul pirena yang terjadi pada detektor MS.

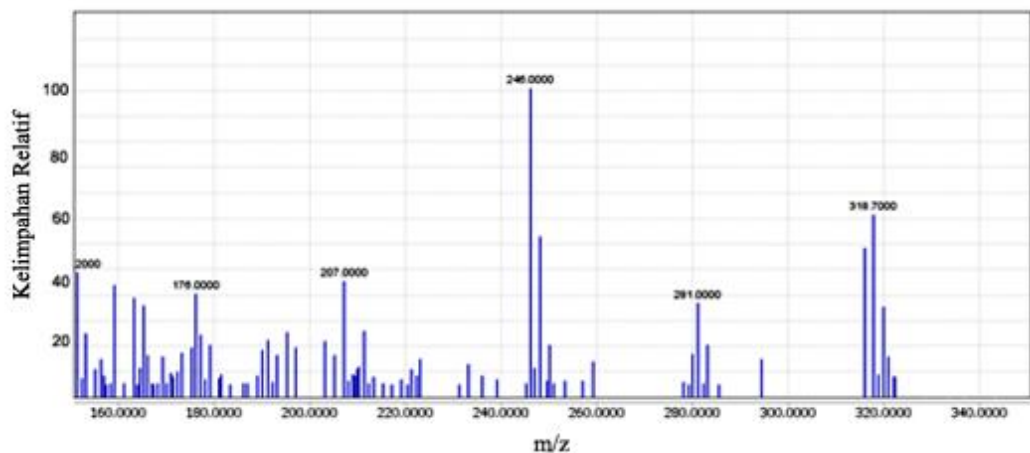


Gambar 4.9. Spektrum MS Pireana hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *D. dickinsii*

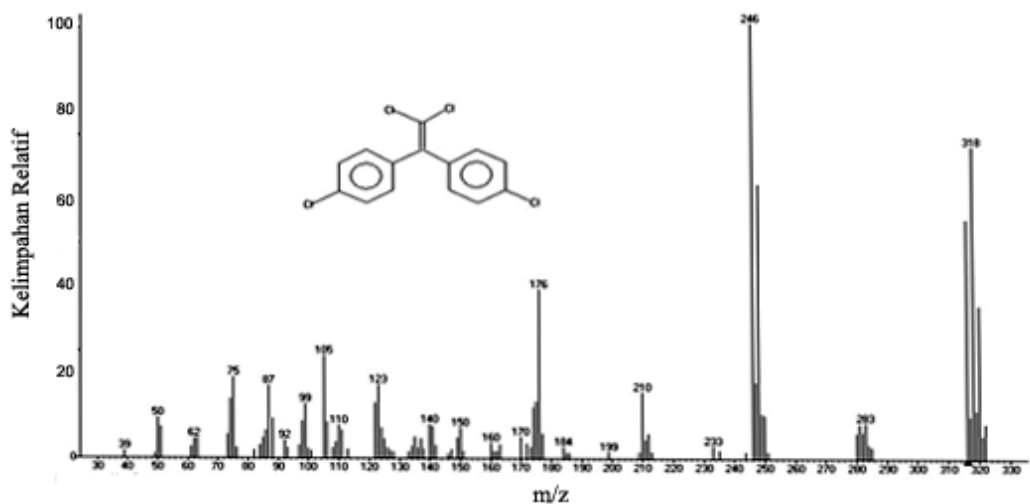


Gambar 4.10. Spektrum MS Pirena database

Pada waktu retensi 12,2 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.11. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul DDE seperti yang ada pada Gambar 4.12. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 318 yang merupakan nilai M^+ dari molekul DDE. DDE merupakan molekul turunan dari DDT yang telah kehilangan 1 atom Cl dan 1 atom H melalui reaksi dehidroklorinasi. Selain kedua spektrum tersebut memiliki nilai M^+ yang sama, kedua spektrum tersebut juga memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 318, 246 (*base peak*), dan 176. Dimana puncak-puncak tersebut merupakan hasil pemecahan molekul DDE yang terjadi pada detektor MS.



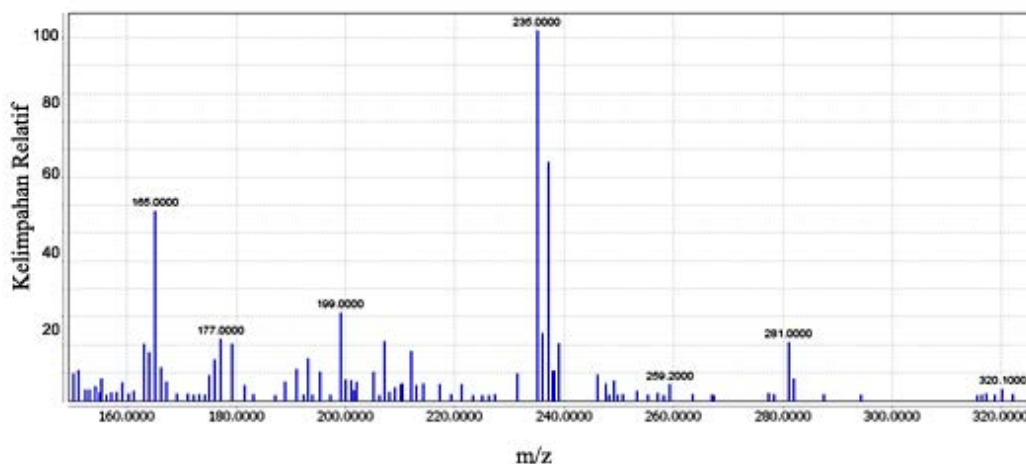
Gambar 4.11. Spektrum MS DDE hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *D. dickinsii*



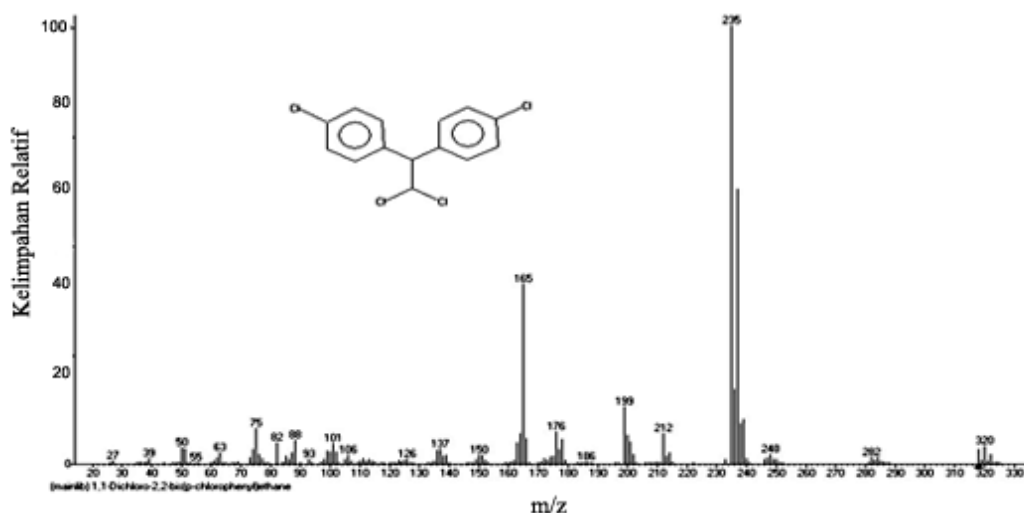
Gambar 4.12. Spektrum MS DDE database

Pada waktu retensi 13,4 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.13. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul DDD seperti yang ada pada Gambar 4.14. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 320 yang merupakan nilai M^+ dari molekul DDD. DDD merupakan molekul turunan dari DDT yang telah kehilangan 1 atom Cl dan disubstitusi oleh atom hidrogen melalui reaksi deklorinasi. Selain kedua spektrum tersebut memiliki nilai M^+ yang sama, kedua spektrum tersebut juga memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 320, 235 (*base peak*), 199 dan

165. Dimana puncak-puncak tersebut merupakan hasil pemecahan molekul DDD yang terjadi pada detektor MS.



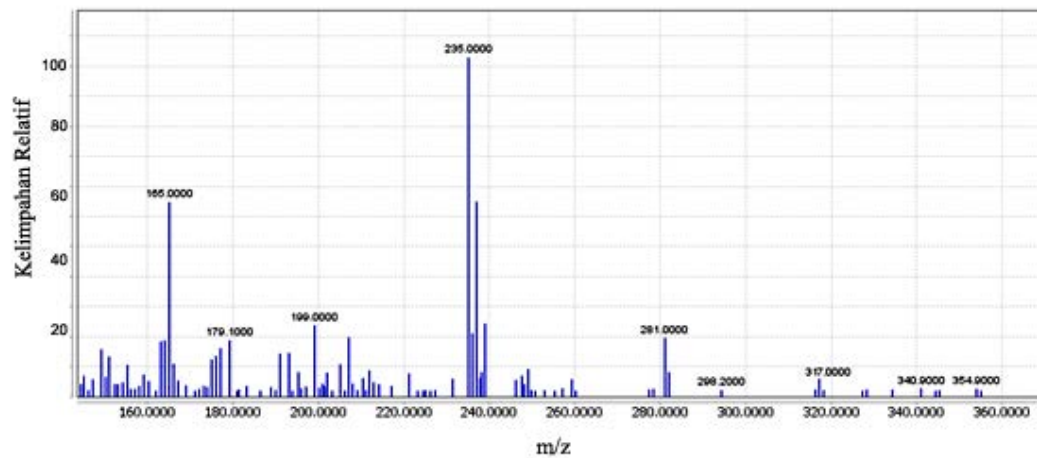
Gambar 4.13. Spektrum MS DDD hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *D. dickinsii*



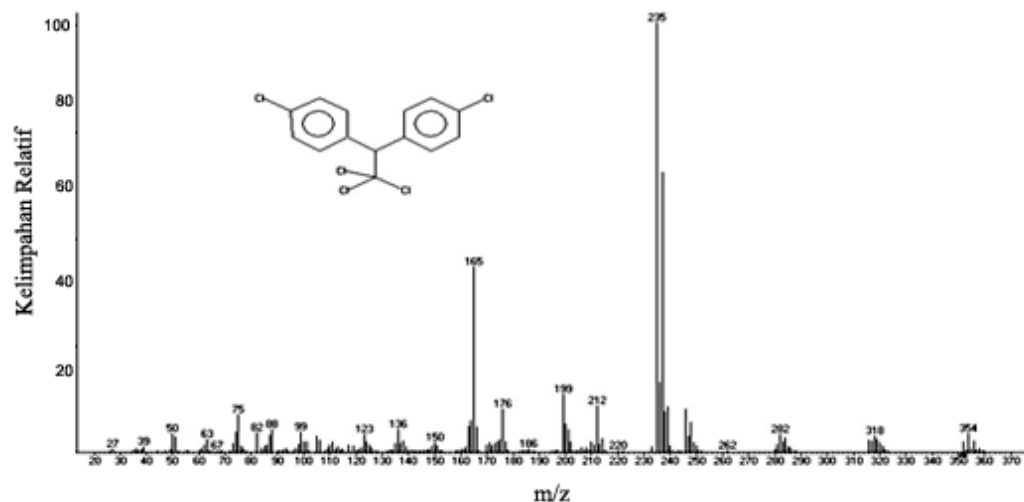
Gambar 4.14. Spektrum MS DDD database.

Pada waktu retensi 14,8 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.15. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul DDT seperti yang ada pada Gambar 4.16. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 354 yang merupakan nilai M^+ dari molekul DDT. DDT masih muncul pada hasil degradasi oleh *D. dickinsii* dikarenakan *D. dickinsii* belum mendegradasi DDT dalam sampel secara sempurna sehingga masih ada sisa DDT dalam sampel yang terbaca oleh GC-MS. Selain memiliki M^+ yang sama kedua spektrum tersebut juga memunculkan puncak pada m/z yang sama

yaitu 354, 235 (*base peak*), dan 165. Dimana puncak-puncak tersebut merupakan hasil pemecahan molekul DDT yang terjadi pada detektor MS.



Gambar 4.15. Spektrum MS DDT hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *D. dickinsii*

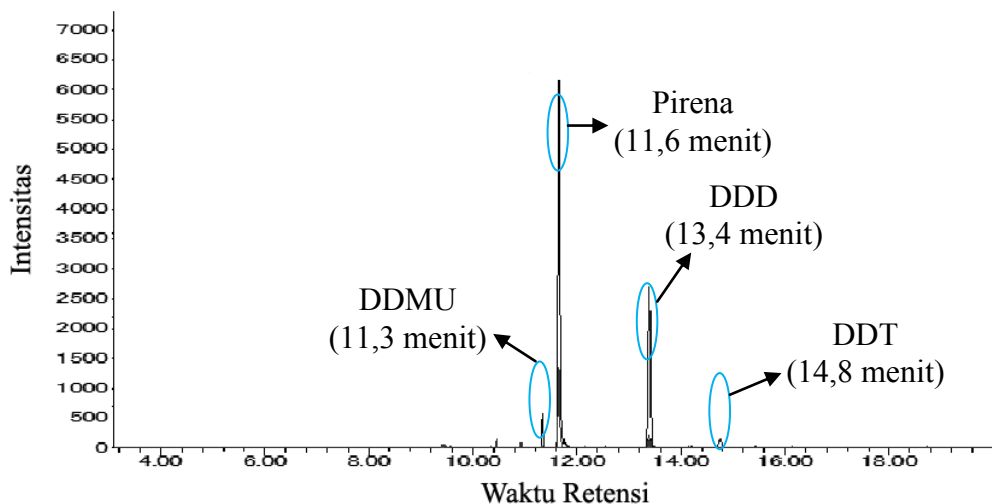


Gambar 4.16. Spektrum MS DDT database

Berdasarkan hasil analisa dengan menggunakan GC-MS dapat diketahui bahwa metabolit produk yang dihasilkan dalam proses biodegradasi DDT oleh *D. dickinsii* antara lain DDE dan DDD. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Purnomo dkk. (2008) yang juga melakukan degradasi DDT dengan *D. dickinsii* dan diperoleh metabolit produk berupa DDE dan DDD.

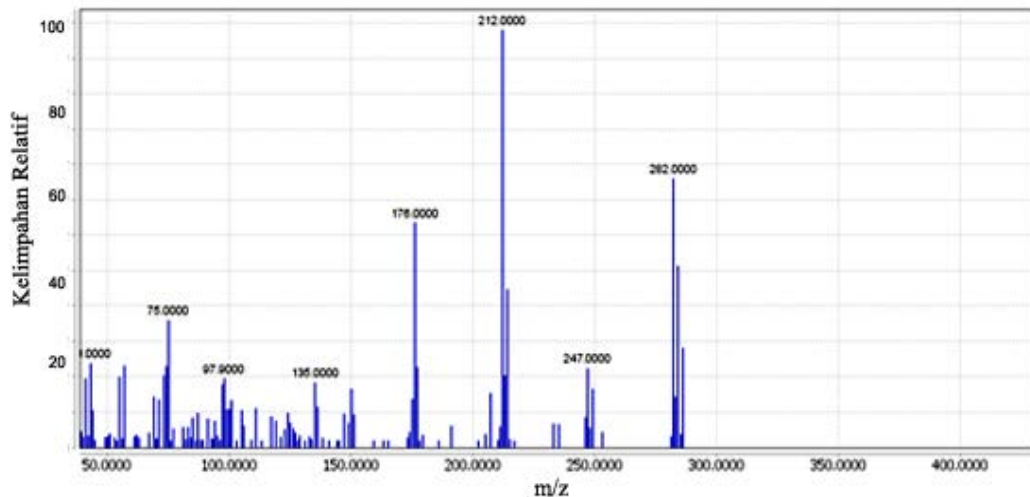
4.8.2. Metabolit Produk Degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*

Berdasarkan hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *P. aeruginosa* dengan menggunakan GC-MS diperoleh kromatogram seperti pada Gambar 4.17. Pada kromatogram tersebut muncul 4 puncak, antara lain DDMU pada waktu retensi 11,3 menit; pirena pada waktu retensi 11,6; DDD pada waktu retensi 13,4 menit dan DDT pada waktu retensi 14,8. Sama halnya pada penentuan metabolit produk DDT dari degradasi oleh *D. dickinsii*, penentuan puncak-puncak tersebut didasarkan pada kecocokan antara spektrum MS pada waktu retensi yang muncul tersebut dengan spektrum MS dari database.

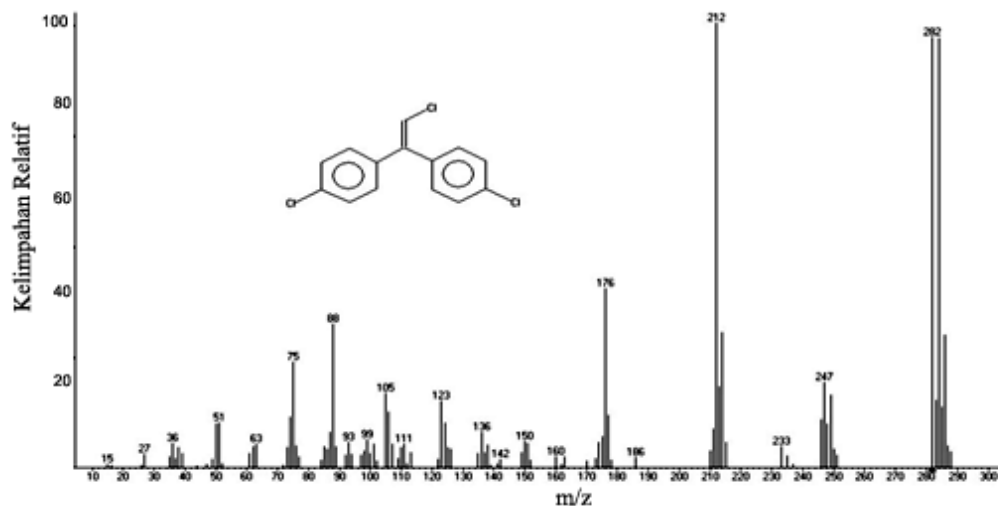


Gambar 4.17. Kromatogram GC-MS sampel degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*

Pada waktu retensi 11,3 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.18. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul DDMU seperti yang ada pada Gambar 4.19. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 282 yang merupakan nilai M^+ dari molekul DDMU. DDMU merupakan senyawa turunan dari DDT yang telah kehilangan 2 atom Cl dan 1 atom hidrogen. Selain memiliki nilai M^+ yang sama, kedua spektrum tersebut sama-sama memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 282, 247, 212 (*base peak*) dan 176. Puncak puncak pada m/z yang sama tersebut merupakan puncak-puncak hasil pemecahan (fragmentasi) molekul DDMU yang terjadi pada detektor MS.

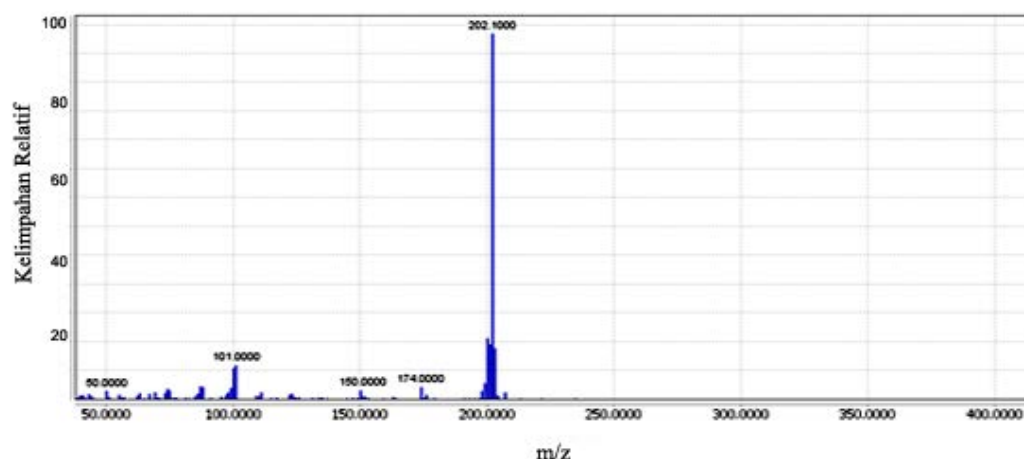


Gambar 4.18. Spektrum MS DDMU hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*

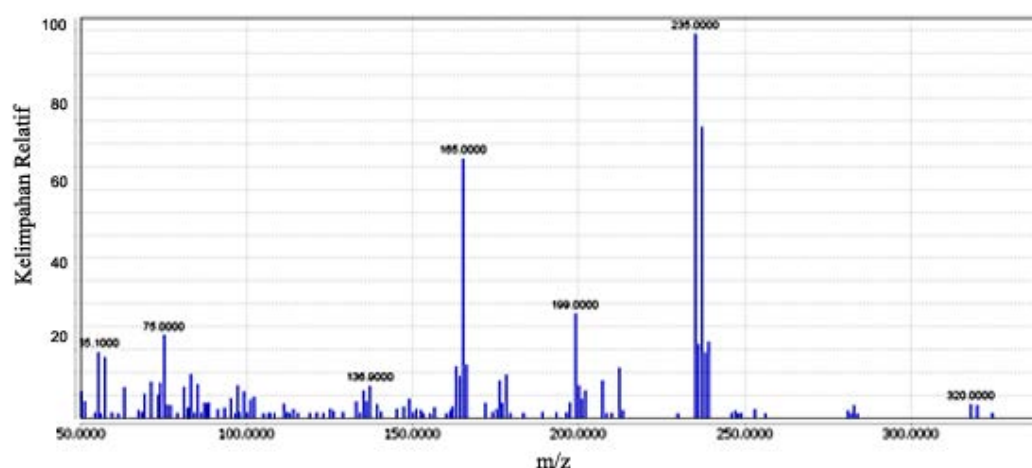


Gambar 4.19. Spektrum MS DDMU database

Pada waktu retensi 11,6 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.20. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul pirena seperti yang ada pada Gambar 4.10. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 202 yang merupakan nilai M^+ dari molekul pirena. Selain itu dari kedua spektrum tersebut sama sama memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 202 (*base peak*), 174, 150 dan 101. Puncak-puncak pada m/z yang sama tersebut merupakan puncak-puncak hasil pemecahan (fragmentasi) molekul pirena yang terjadi pada detektor MS.

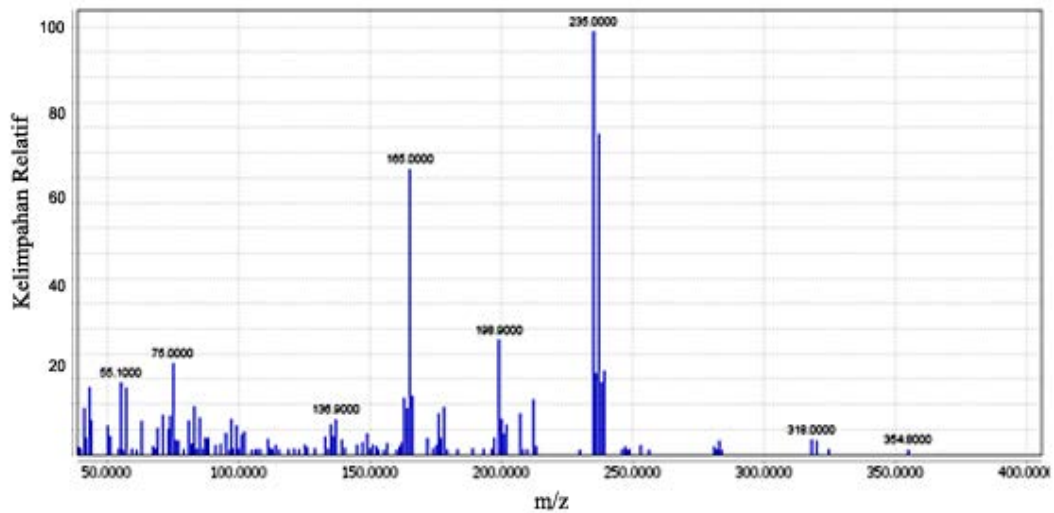


Gambar 4.20. Spektrum MS pirena hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*



Gambar 4.21. Spektrum MS DDD hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*

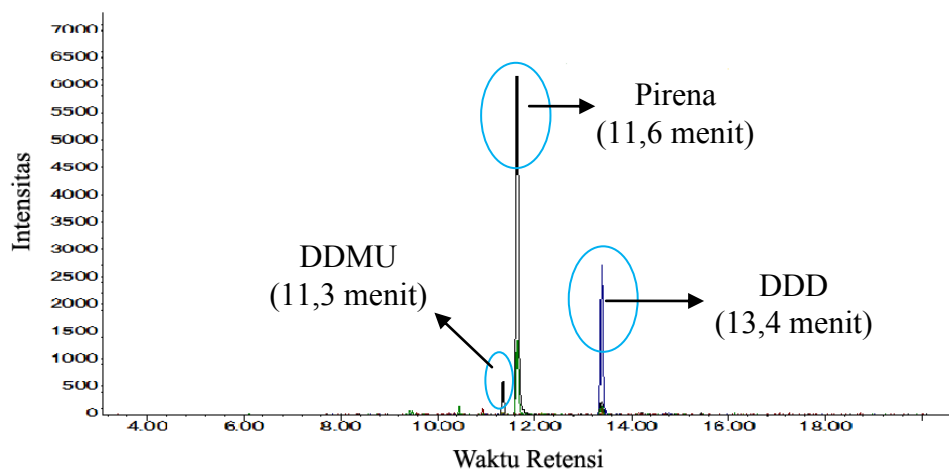
Pada waktu retensi 13,4 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.21. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul DDD seperti yang ada pada Gambar 4.14. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 320 yang merupakan nilai M^+ dari molekul DDD. DDD merupakan molekul turunan dari DDT yang telah kehilangan 1 atom Cl dan disubstitusi oleh atom hidrogen melalui reaksi deklorinasi. Selain kedua spektrum tersebut memiliki nilai M^+ yang sama, kedua spektrum tersebut juga memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 320, 235(*base peak*), 199 dan 165. Dimana puncak-puncak tersebut merupakan hasil pemecahan molekul DDD yang terjadi pada detektor MS.



Gambar 4.22. Spektrum MS DDT hasil analisa sampel degradasi DDT oleh *P. aeruginosa*

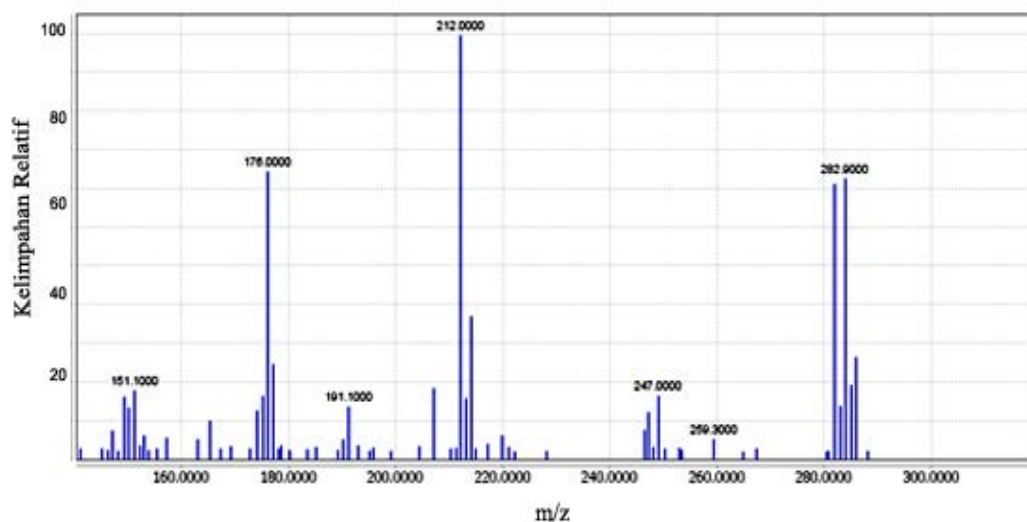
Berdasarkan kromatogram dan spektrum MS diatas hasil metabolit produk dari proses degradasi DDT oleh *P. aeruginosa* menghasilkan molekul DDMU dan DDD. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Bidlan (2003) yang juga menemukan DDMU sebagai produk minor dan DDD sebagai produk major yang dihasilkan dari proses biodegradasi DDT oleh *P. aeruginosa*.

4.8.3. Metabolit Produk Degradasi DDT oleh Campuran *D. dickinsii* dengan 10 mL *P. aeruginosa*



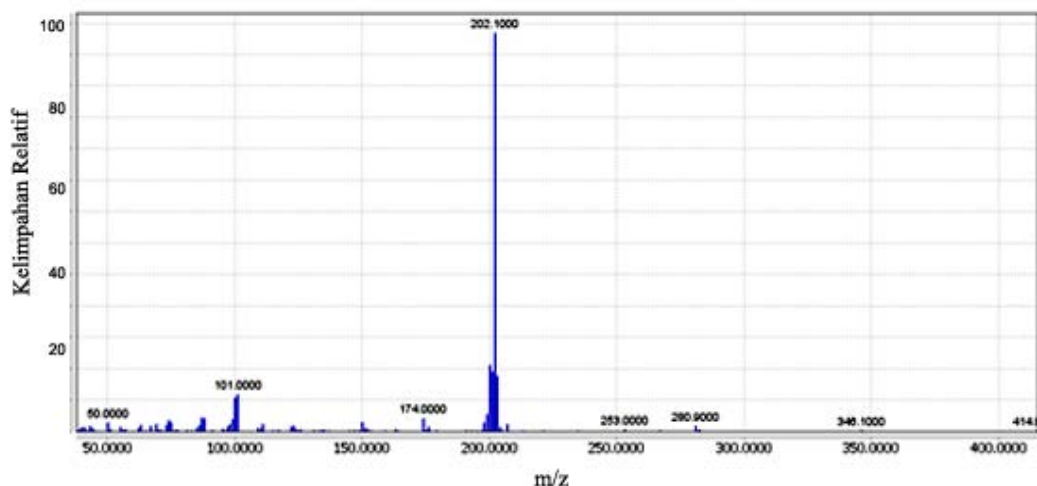
Gambar 4.23. Kromatogram GC-MS sampel degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan 10 mL *P. aeruginosa*

Berdasarkan hasil analisa GC-MS sampel degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan 10mL *P. aeruginosa* diperoleh kromatogram seperti pada Gambar 4.23. Pada kromatogram tersebut muncul 3 puncak, antara lain DDMU pada waktu retensi 11,3 menit, pirena pada waktu retensi 11,6, dan DDD pada waktu retensi 13,4. Sama halnya pada penentuan metabolit produk DDT dari degradasi oleh *D. dickinsii* dan *P. aeruginosa*, penentuan puncak-puncak tersebut didasarkan pada kecocokan antara spektrum MS pada waktu retensi yang muncul tersebut dengan spektrum MS dari database.



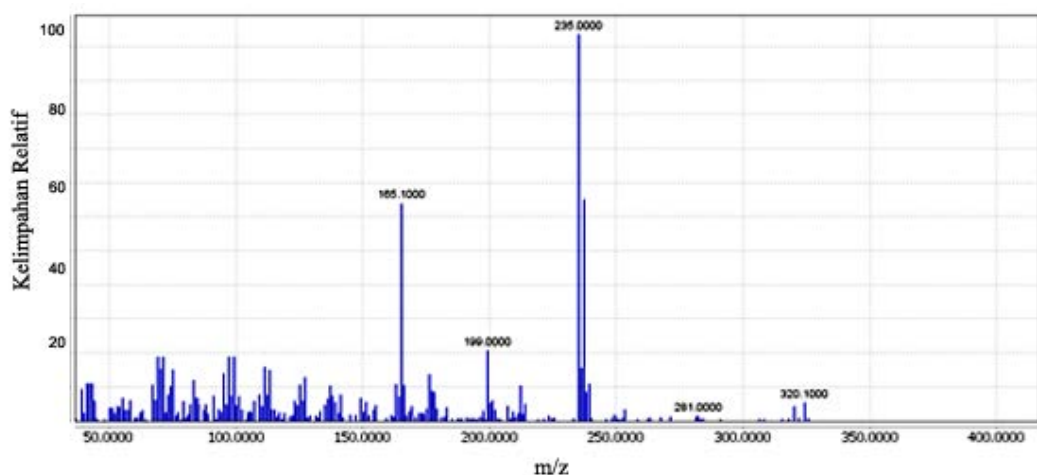
Gambar 4.24. Spektrum MS DDMU hasil analisa sampel degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan 10 mL *P. aeruginosa*

Pada waktu retensi 11,3 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.24. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul DDMU seperti yang ada pada Gambar 4.19. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 282 yang merupakan nilai M^+ dari molekul DDMU. DDMU merupakan senyawa turunan dari DDT yang telah kehilangan 2 atom Cl dan 1 atom hidrogen. Selain memiliki nilai M^+ yang sama, kedua spektrum tersebut sama-sama memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 282, 247, 212 (*base peak*) dan 176. Puncak puncak pada m/z yang sama tersebut merupakan puncak-puncak hasil pemecahan (fragmentasi) molekul DDMU yang terjadi pada detektor MS.



Gambar 4.25. Spektrum MS Pirena hasil analisa sampel degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan 10 mL *P. aeruginosa*

Pada waktu retensi 11,6 memiliki spektrum MS seperti pada gambar 4.25. Spektrum tersebut cocok dengan spektrum MS dari database untuk molekul pirena seperti yang ada pada Gambar 4.10. Kedua spektrum tersebut sama-sama memiliki nilai M^+ sebesar 202 yang merupakan nilai M^+ dari molekul pirena. Selain itu dari kedua spektrum tersebut sama sama memunculkan puncak pada m/z yang sama yaitu 202 (*base peak*), 174, dan 101. Puncak-puncak pada m/z yang sama tersebut merupakan puncak-puncak hasil pemecahan (*fragmentasi*) molekul pirena yang terjadi pada detektor MS.



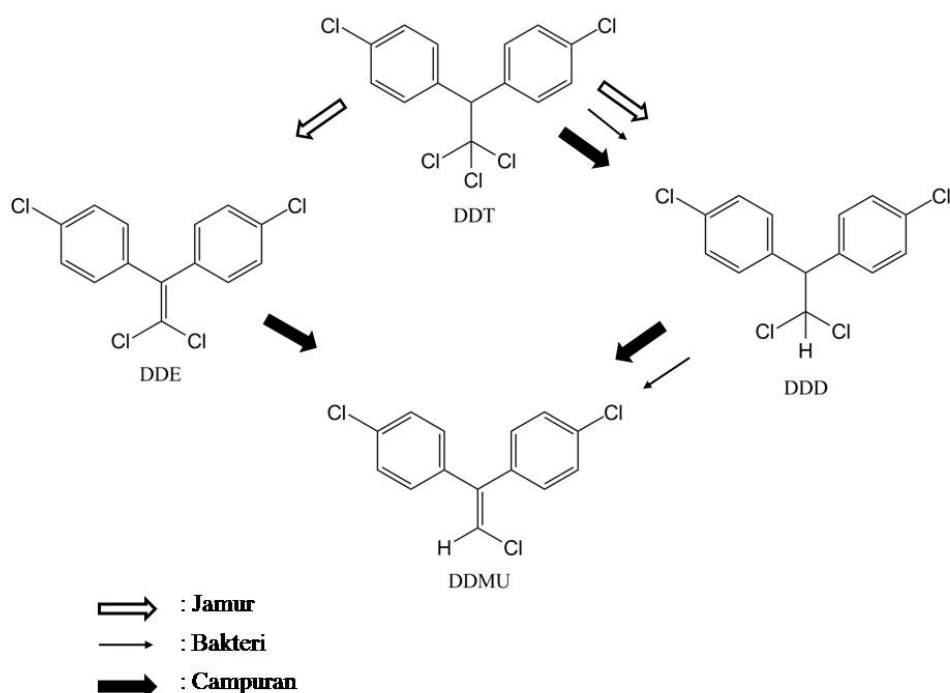
Gambar 4.26. Spektrum MS DDD hasil analisa sampel degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan 10 mL *P. aeruginosa*

Berdasarkan kromatogram GC-MS dan spektrum MS tersebut dapat diketahui bahwa metabolit produk yang dihasilkan dalam proses degradasi DDT

oleh campuran *D. dickinsii* dan *P. aeruginosa* berupa molekul DDMU dan DDD. Pada analisa metabolit produk dari hasil degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* tidak ditemui sisa DDT. Hal tersebut dikarenakan pada degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* DDT telah terdegradasi sempurna sehingga tidak ditemukan sisa pada analisa dengan menggunakan GC-MS. Pada degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* tersebut juga tidak ditemui metabolit produk DDE. Hal tersebut dapat dimungkinkan karena DDE yang dihasilkan oleh jamur *D. dickinsii* diuraikan lebih lanjut menjadi DDMU oleh *P. aeruginosa*. Quensen dkk. (1998) melaporkan bahwa beberapa jenis bakteri mampu mengkonversi DDE menjadi DDMU melalui reaksi reduksi deklorinasi.

4.8.4. Jalur Degradasi

Dalam penelitian ini jalur degradasi dibuat dengan melihat metabolit produk dari degradasi DDT oleh *D. dickinsii*, *P. aeruginosa*, dan campuran antara *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa*. Dalam penelitian ini degradasi DDT oleh *D. dickinsii* menghasilkan metabolit produk DDE dan DDD. Degradasi DDT oleh *P. aeruginosa* menghasilkan metabolit produk DDMU dan DDD. Degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* menghasilkan metabolit produk DDMU dan DDD. Dari data metabolit produk masing-masing proses degradasi tersebut maka jalur degradasi yang dimungkinkan digambarkan pada Gambar 4.27. Dalam jalur degradasi tersebut degradasi DDT oleh *D. dickinsii* menghasilkan metabolit produk DDE, namun untuk degradasi DDT oleh campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* tidak ditemukan DDE. Hal tersebut dapat dikarena DDE yang dihasilkan oleh *D. dickinsii* didegradasi lebih lanjut oleh *P. aeruginosa* menjadi DDMU dalam kultur campuran sehingga dalam kultur campuran hanya ditemukan metabolit produk DDD dan DDMU. Dalam penelitian sebelumnya Quensen dkk. (1998) menjelaskan bahwa DDE mampu dikonversi oleh beberapa jenis bakteri menjadi DDMU melalui reaksi reduksi deklorinasi. Dalam penelitian lain Sari dkk. (2012) menyebutkan DDT berubah menjadi DDE melalui reaksi dehidroklorinasi, DDT menjadi DDD melalui reaksi deklorinasi dan DDD menjadi DDMU melalui reaksi dehidroklorinasi.



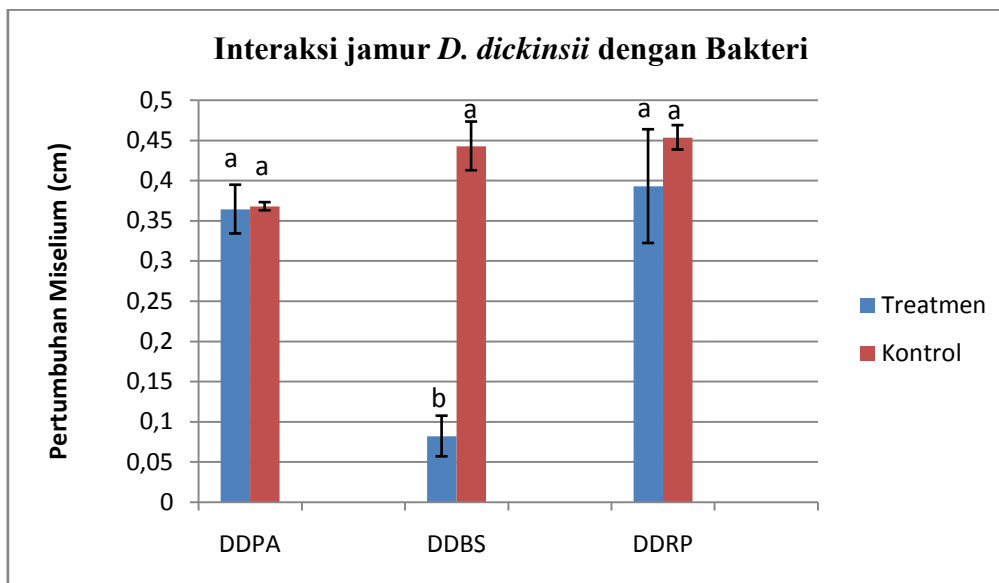
Gambar 4.27. Prakiraan Jalur degradasi DDT oleh *D. dickinsii*, *P. aeruginosa* dan campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa*

4.9. Uji Interaksi *D. dickinsii* dengan Bakteri

Interaksi antara *D. dickinsii* dengan masing-masing bakteri telah diteliti. Assay interaksi antara *D. dickinsii* dengan masing-masing bakteri bertujuan untuk mengetahui apakah ada efek tertentu dari penambahan bakteri terhadap kultur jamur *D. dickinsii*. Kamei dkk. (2011) menjelaskan bahwa uji interaksi antara jamur dan bakteri penting dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang ditambahkan dapat hidup bersama dengan kultur jamur atau bahkan akan menghambat pertumbuhan jamur.

Assay interaksi ini dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 plug (diameter 9mm) miselium jamur *D. dickinsii* kedalam media PDA dalam petri disk kemudian ditambahkan 10 μ L kultur bakteri yang telah di pre-inkubasi dengan jarak 2 cm dari miselium jamur. Sebagai kontrol, jamur *D. dickinsii* ditumbuhkan tanpa penambahan bakteri. Kultur yang telah dibuat selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C. Setelah masa inkubasi 3 hari dilakukan perhitungan pertumbuhan miselium perhari sampai petridisk dipenuhi miselium. Dalam penelitian ini interaksi dilakukan dalam media PDA dikarenakan PDA merupakan

media yang baik untuk pertumbuhan jamur (Djarjah, 2001). Selain itu assay interaksi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh bakteri terhadap pertumbuhan jamur sehingga mediatanam dan kondisi inkubasi yang digunakan menyesuaikan dengan media tanam dan kondisi inkubasi jamur. Dalam penelitian ini pengukuran pertumbuhan miselium dilakukan mulai hari ke 3 inkubasi dikarenakan pada hari pertama dan kedua bakteri dan jamur masih dalam masa adaptasi terhadap media barudan masih belum terjadi kontak antara jamur dengan bakteri (Kamei dkk.,2011).

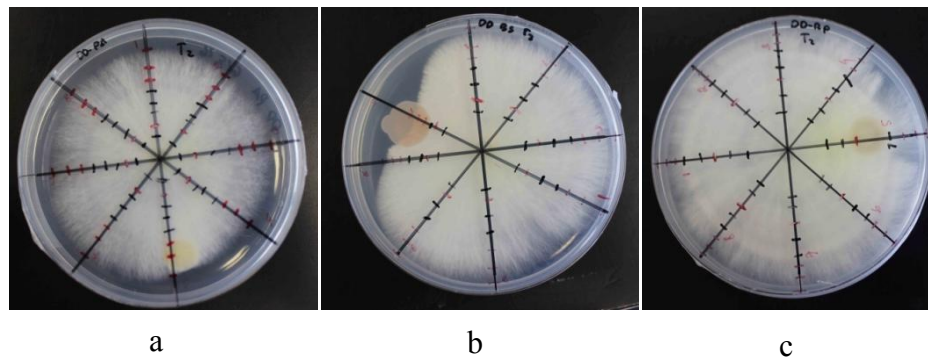


Gambar 4.28. Data interaksi antara jamur *D. dickinsii* dengan bakteri. DD = *D. dickinsii*, PA = *P. aeruginosa*, BS = *B. subtilis*. Perbedaan alfabet pada data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari hasil uji t dengan $n=2$ dan $\alpha=0,05$.

Hasil dari uji interaksi antara jamur *D. dickinsii* dengan masing-masing bakteri ditampilkan pada Gambar 4.28. dengan visualisasi seperti pada Gambar 4.29. Pada gambar 4.28. Interaksi antara jamur dengan bakteri dikatakan baik apabila penambahan bakteri tidak memberikan hambatan pada pertumbuhan miselium jamur atau bahkan dapat meningkatkan pertumbuhan miselium jamur yang ditunjukan oleh adanya kesamaan antara treatment dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri) atau pertumbuhan miselium treatment lebih tinggi dibanding pada kontrol (tanpa penambahan bakteri) (Kamei dkk., 2011).

Interaksi antara jamur *D. dickinsii* dengan bakteri *P. aeruginosa* dan *R. picketii* tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara pertumbuhan

miselium treatment dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri). Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* dan *R. picketii* dapat hidup bersama jamur *D. dickinsii* dan tidak memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan miselium jamur *D. dickinsii*. Akan tetapi, pertumbuhan miselium pada treatment *D. dickinsii* dengan bakteri *B. subtilis* jauh lebih rendah dan berbeda signifikan dengan kontrol (tanpa penambahan bakteri). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan bakteri *B. subtilis* menghambat pertumbuhan miselium jamur *D. dickinsii*. Penghambatan pertumbuhan miselium *D. dickinsii* pada penambahan bakteri *B. subtilis* dapat terjadi dikarenakan bakteri *B. subtilis* mampu memproduksi metabolit sekunder berupa lipopeptida yang memiliki sifat anti mikrobial sehingga memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan miselium *D. dickinsii* (Banat dkk., 2010).



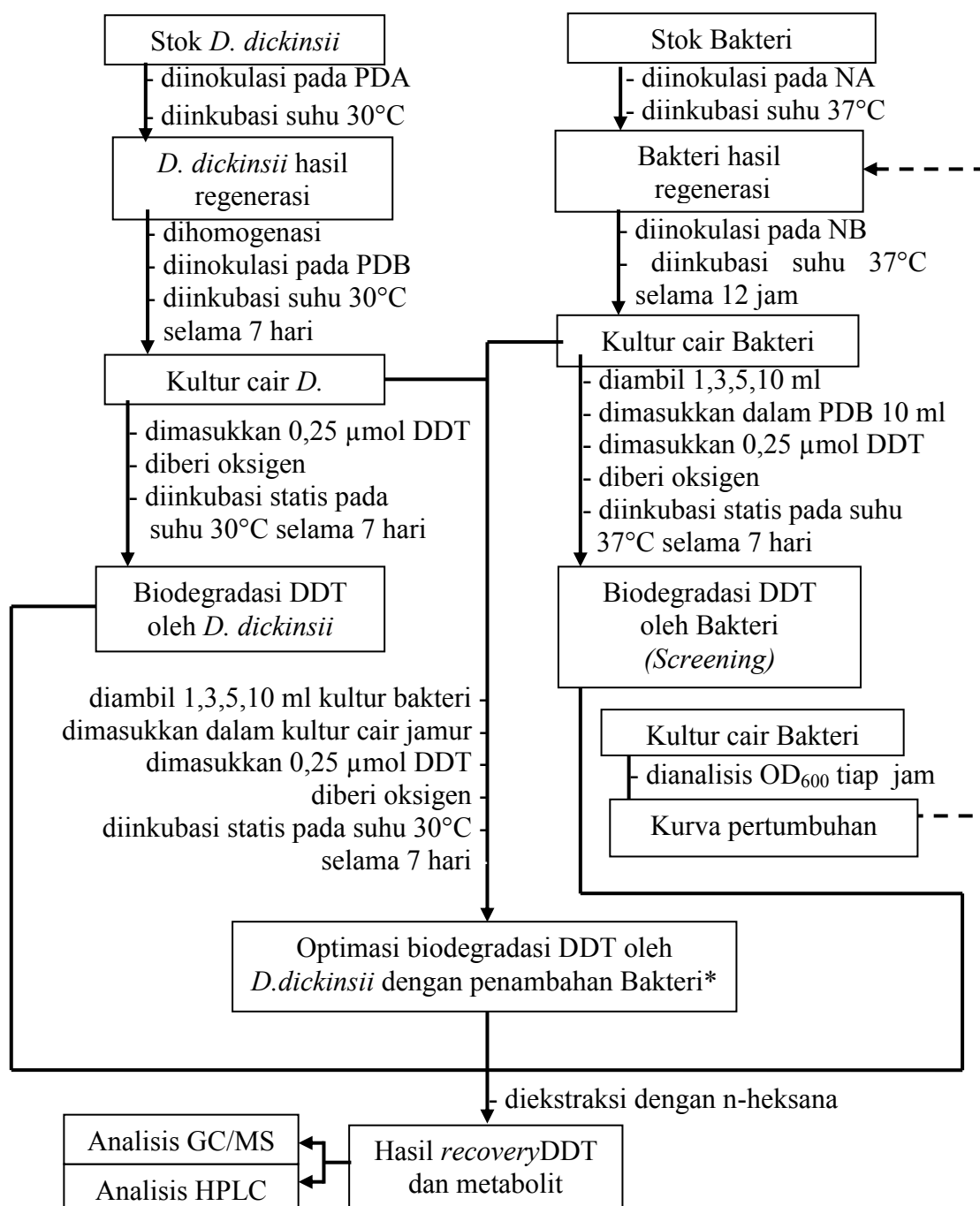
Gambar 4.29. Visualisasi interaksi jamur *D. dickinsii* dengan bakteri a. *P. aeruginosa*, b. *B. subtilis*, dan c. *R. pickettii*

Berdasarkan assay hasil interaksi tersebut dapat diketahui bahwa penambahan bakteri *P. aeruginosa* tidak memberikan hambatan terhadap pertumbuhan miselium jamur *D. dickinsii*. Dengan demikian maka bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri yang baik untuk meningkatkan kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja



Keterangan : Bakteri yang digunakan adalah *P. aeruginosa*, *B. subtilis* dan *R. pickettii*

*Dilakukan variasi waktu penambahan bakteri pada 0, 1, 3, 5 hari setelah penambahan DDT

Lampiran 2. Perhitungan

1. Pembuatan Larutan DDT 5 mM dalam 50 mL DMSO

$$\begin{aligned}n &= M \cdot V \\&= 5 \times 10^{-3} \text{ M} \cdot 0,05 \text{ L} \\&= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa} &= n \cdot \text{Mr} \\&= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot 354,49 \text{ g/mol} \\&= 0,0886225 \text{ g DDT (Teori)}\end{aligned}$$

Massa yang ditimbang = 0,0905 g DDT

$$\begin{aligned}n &= \text{massa} / \text{Mr} \\n &= 0,0905 \text{ g} / 354,49 \text{ g/mol} \\n &= 2,55 \times 10^{-4} \text{ mol}\end{aligned}$$

2. Pembuatan Larutan Pirena 5 mM dalam 50 mL DMSO

$$\begin{aligned}n &= M \cdot V \\&= 5 \times 10^{-3} \text{ M} \cdot 0,05 \text{ L} \\&= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Massa} &= n \cdot \text{Mr} \\&= 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot 202,25 \text{ g/mol} \\&= 0,0505625 \text{ g Pirena (Teori)}\end{aligned}$$

Massa yang ditimbang = 0,0504 g Pirena

$$\begin{aligned}n &= \text{massa} / \text{Mr} \\n &= 0,0504 \text{ g} / 202,25 \text{ g/mol} \\n &= 2,49 \times 10^{-4} \text{ mol}\end{aligned}$$

Lampiran 3. Data Luas Puncak HPLC Kurva Standard DDT

Konsentrasi DDT	Luas pirena	Luas DDT	perbandingan DDT/pirena	rata2	SD
0	0	0	0	0	0
	0	0	0		
25	81132,8	8133,85	0,100	0,104	0,006
	76696,94	8291,78	0,108		
50	80616,66	17689,29	0,219	0,219	0,001
	79033,15	17256,62	0,218		
75	79892,88	24232,41	0,303	0,301	0,003
	76780,01	22970,71	0,299		
100	76994,95	29698,65	0,386	0,387	0,002
	74100,91	28740,36	0,388		

Lampiran 4. Data Analisis HPLC Sampel
Contoh Perhitungan Persen *Recovery*

Persamaan regresi linear kurva standar DDT

$$y = 0,004 x$$

$$0,3857 = 0,004 x$$

$$x = 0,3857/0,004$$

$$x = 96,43 \%$$

Dimana : y = Perbandingan
luas area puncak
DDT/pirena
x = Persen *recovery*

% Degradasi = % recovery kontrol - % recovery sampel

Tabel 1. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Jamur *D. dickinsii*

Ket.	n	Pirena	DDT	DDT/ Pirena	Recovery	Rata- rata	SD	Degradasi
Kontrol	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
Dengan jamur	T1	7961,67	1459,63	0,18	45,83	43,09	3,88	53,61
	T2	7899,8	1275,03	0,16	40,35			

Tabel 2. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Bakteri *P. aeruginosa*

Kons. Bakteri (mL)	n	Pirena	DDT	DDT/ Pirena	Recovery	Rata- rata	SD	Degradasi
0	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
1	T1	22686,44	1821,10	0,08	20,07	21,53	2,06	75,17
	T2	15296,74	1406,53	0,09	22,99			
3	T1	5964,21	308,12	0,05	12,92	14,57	2,34	82,13
	T2	3698,10	239,96	0,06	16,22			
5	T1	6207,37	252,80	0,04	10,18	10,54	0,51	86,15
	T2	5941,35	259,13	0,04	10,90			
7	T1	1789101	45685	0,03	6,38	6,49	0,16	90,20
	T2	2429672	64176	0,03	6,60			
10	T1	103172,68	12422,83	0,12	30,10	30,72	0,87	65,98
	T2	92895,41	11643	0,13	31,33			

Tabel 3. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Bakteri *B. subtilis*

Kons. Bakteri (mL)	n	Pirena	DDT	DDT/ Pirena	Recovery	Rata-rata	SD	Degradasi
0	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
1	T1	3227,32	733,43	0,23	56,81	61,31	6,36	35,38
	T2	4447,71	1170,91	0,26	65,82			
3	T1	9210,99	1139,93	0,12	30,94	30,48	0,64	66,21
	T2	5247,07	630,29	0,12	30,03			
5	T1	12091,33	829,65	0,07	17,15	17,18	0,04	79,51
	T2	9608,3	661,51	0,07	17,21			
7	T1	2283747	158517	0,07	13,88	12,64	1,76	84,06
	T2	1416452	80739	0,06	11,40			
10	T1	1922014	109731	0,06	11,42	10,26	1,64	86,44
	T2	2634638	119793	0,05	9,09			

Tabel 4. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Bakteri *R. pickettii*

Kons. Bakteri (mL)	n	Pirena	DDT	DDT/ Pirena	Recovery	Rata-rata	SD	Degradasi
0	C1	76994,95	29698,65	0,39	96,43	96,70	0,38	-
	C2	74100,91	28740,36	0,39	96,96			
1	T1	645110	228464	0,35	88,54	88,07	0,65	8,62
	T2	603386	211455	0,35	87,61			
3	T1	14776,09	4964,6	0,34	84,00	84,62	0,88	12,08
	T2	14919,79	5087,19	0,34	85,24			
5	T1	8210,44	2715,12	0,33	82,67	81,05	2,29	15,64
	T2	8707,32	2766,57	0,32	79,43			
7	T1	8936,46	2366,16	0,26	66,19	65,83	0,52	30,87
	T2	8991,7	2354,26	0,26	65,46			
10	T1	9762,26	3017,55	0,31	77,28	76,85	0,60	19,84
	T2	7937,07	2426,63	0,31	76,43			

Tabel 5. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Campuran Jamur *D. dickinsii* dengan Bakteri *P. aeruginosa*

Kons. Bakteri (mL)	n	Pirena	DDT	DDT/Pirena	Recovery	Rata-rata	SD	Degradasi
0	T1	7961,67	1459,63	0,18	45,83	43,09	3,88	53,61
	T2	7899,8	1275,03	0,16	40,35			
1	T1	5297,72	787,93	0,15	37,18	38,12	1,33	58,61
	T2	3361,82	525,33	0,16	39,07			
3	T1	5203,32	878,32	0,17	42,20	41,88	0,45	54,82
	T2	4676,72	777,53	0,17	41,56			
5	T1	6707,52	1191,57	0,18	44,41	44,95	0,77	51,74
	T2	7195,49	1309,4	0,18	45,49			
7	T1	14561,52	545,06	0,04	9,36	9,19	0,24	87,51
	T2	10471,85	377,77	0,04	9,02			
10	T1	11321,72	0	0,00	0,00	0,00	0,00	100
	T2	12509,52	0	0,00	0,00			

Tabel 6. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Campuran Jamur *D. dickinsii* dengan Bakteri *B. subtilis*

Kons. Bakteri (mL)	n	Pirena	DDT	DDT/Pirena	Recovery	Rata-rata	SD	Degradasi
0	T1	7961,67	1459,63	0,18	45,83	43,09	3,88	53,61
	T2	7899,8	1275,03	0,16	40,35			
1	T1	5303,16	433,36	0,08	20,43	22,36	2,73	74,33
	T2	4164,21	404,71	0,10	24,30			
3	T1	6690,43	873,75	0,13	32,65	32,50	0,21	64,20
	T2	5879,84	760,86	0,13	32,35			
5	T1	8507,69	1356,11	0,16	39,85	39,64	0,30	57,06
	T2	6632,18	1046,01	0,16	39,43			
7	T1	3701,44	515,89	0,14	34,84	33,46	1,96	63,24
	T2	4505,17	577,94	0,13	32,07			
10	T1	3278,61	352,54	0,11	26,88	29,09	3,13	67,60
	T2	5935,62	743,23	0,13	31,30			

Tabel 7. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Campuran Jamur *D. dickinsii* dengan Bakteri *R. pickettii*

Kons. Bakteri (mL)	n	Pirena	DDT	DDT/ Pirena	Recovery	Rata-rata	SD	Degradasi
0	T1	7961,67	1459,63	0,18	45,83	43,09	3,88	53,61
	T2	7899,8	1275,03	0,16	40,35			
1	T1	4800,93	801,02	0,17	41,71	42,71	1,41	53,99
	T2	10415,58	1820,77	0,17	43,70			
3	T1	13646,36	1898,35	0,14	34,78	34,40	0,54	62,30
	T2	12555,97	1708,51	0,14	34,02			
5	T1	9342,02	1637,19	0,18	43,81	44,49	0,95	52,21
	T2	9155,86	1653,96	0,18	45,16			
7	T1	15506,17	2220,19	0,14	35,80	35,77	0,04	60,93
	T2	11126,19	1590,41	0,14	35,74			
10	T1	15643,29	1677,29	0,11	26,81	28,08	1,80	68,62
	T2	15506,17	1820,19	0,12	29,35			

Tabel 8. Data Luas Puncak Analisis Sampel pada Campuran Jamur *D. dickinsii* dengan Bakteri *P. aeruginosa* Variasi Waktu Penambahan Bakteri

Hari ke-	n	Pirena	DDT	DDT/ Pirena	Recovery	Rata-rata	SD	Degradasi
0	T1	11321,72	0	0,00	0,00	0,00	0,00	100
	T2	12509,52	0	0,00	0,00			
1	T1	5203,32	878,32	0,17	42,20	41,88	0,45	54,82
	T2	4676,72	777,53	0,17	41,56			
3	T1	6707,52	1191,57	0,18	44,41	44,95	0,77	51,74
	T2	7195,49	1309,4	0,18	45,49			
5	T1	687899	2016,06	0,00	0,73	0,43	0,42	96,26
	T2	714209	377,77	0,00	0,13			

Lampiran 5 Uji signifikasi (Uji t)

Dalam penelitian ini uji signifikansi dilakukan dengan menggunakan uji t two tail equal variant dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$r = \frac{\sum[(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\sum[(X_i - \bar{X})^2(Y_i - \bar{Y})^2]}}$$

H_0 diterima, jika $t_{hitung} < t_{tabel}$ (Tidak berbeda signifikan)

H_0 ditolak, jika $t_{hitung} > t_{tabel}$ (Berbeda signifikan)

Karena $t_{hitung} > t_{tabel}$, maka H_0 ditolak

$$t_{hitung} = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Tabel 1. Tabel t (Titik Persentase Distribusi t (df = 1-10))

α untuk Uji Satu Pihak (<i>one tail test</i>)						
dk	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005
	α untuk Uji Dua Pihak (<i>two tail test</i>)					
	0,50	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01
1	1,000	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169

Tabel 2. Uji t degradasi DDT oleh Bakteri

PA				BS				RP			
Data	T hit	T tab	ket	Data	T hit	T tab	ket	Data	T hit	T tab	ket
PA 1:3	3,16	4,30	sama	BS 1:3	6,82	4,30	beda	RP 1:3	4,45	4,30	beda
PA 1:5	7,31	4,30	beda	BS 1:5	9,81	4,30	beda	RP 1:5	4,17	4,30	sama
PA 1:7	10,27	4,30	beda	BS 1:7	10,43	4,30	beda	RP 1:7	37,61	4,30	beda
PA 1:10	5,80	4,30	beda	BS 1:10	10,98	4,30	beda	RP 1:10	17,93	4,30	beda
PA 3:5	2,38	4,30	sama	BS 3:5	29,21	4,30	beda	RP 3:5	2,06	4,30	sama
PA 3:7	4,87	4,30	beda	BS 3:7	13,50	4,30	beda	RP 3:7	25,97	4,30	beda
PA 3:10	9,15	4,30	beda	BS 3:10	16,21	4,30	beda	RP 3:10	10,33	4,30	beda
PA 5:7	10,73	4,30	beda	BS 5:7	3,66	4,30	sama	RP 5:7	9,16	4,30	beda
PA 5:10	28,26	4,30	beda	BS 5:10	5,96	4,30	beda	RP 5:10	2,51	4,30	sama
PA 7:10	38,73	4,30	beda	BS 7:10	1,40	4,30	sama	RP 7:10	19,70	4,30	Beda

Tabel 3. Uji t degradasi DDT oleh campuran kultur *D. dickinsii* -Bakteri

DDPA			
Data	T hit	T tab	Ket
DD-DDPA1	1,71	4,30	sama
DD-DDPA3	0,44	4,30	sama
DD-DDPA5	0,67	4,30	sama
DD-DDPA7	12,34	4,30	beda
DD-DDPA10	15,72	4,30	beda

DDBS			
Data	T hit	T tab	Ket
DD-DDBS1	6,18	4,30	beda
DD-DDBS3	3,86	4,30	sama
DD-DDBS5	1,26	4,30	sama
DD-DDBS7	3,14	4,30	sama
DD-DDBS10	3,97	4,30	sama

DDRP			
Data	T hit	T tab	ket
DD-DDRP1	0,13	4,30	sama
DD-DDRP3	3,14	4,30	sama
DD-DDRP5	0,49	4,30	sama
DD-DDRP7	2,67	4,30	sama
DD-DDRP10	4,97	4,30	beda

Tabel 4. Uji t degradasi DDT oleh campuran kultur *D. dickinsii* –*P. aeruginosa* variasi waktu penambahan bakteri

DDPA			
Sample	T hit	T tab	ket
H0:H1	131,68	4,30	beda
H0:H3	83,09	4,30	beda
H0:H5	1,44	4,30	sama
H1:H3	4,89	4,30	beda
H1:H5	94,77	4,30	beda
H3:H5	71,95	4,30	beda
DD -H0	15,72	4,30	beda
DD -H1	0,44	4,30	sama
DD -H3	0,67	4,30	sama
DD -H5	15,47	4,30	beda

Tabel 5. Uji t uji interaksi antara *D. dickinsi* dengan bakteri

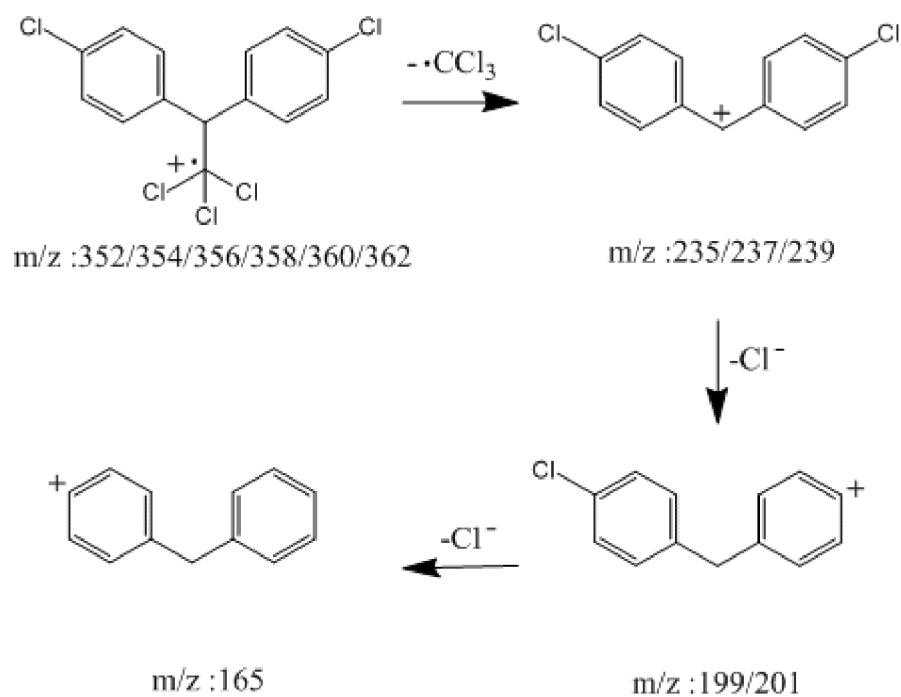
Sample	T hitung	T tabel	Ket
DDPA - KPA	0,16	4,30	sama
DDPA- DDBS	10,11	4,30	beda
DDPA -KBS	2,59	4,30	sama
DDPA-DDRP	0,53	4,30	sama
DDPA-KRP	3,73	4,30	sama
DDBS-KBS	12,93	4,30	beda
DDBS-KPA	15,69	4,30	beda
DDBS-DDRP	5,85	4,30	beda
DDBS-KRP	17,84	4,30	beda
DDRP-KPA	0,50	4,30	sama
DDRP-KBS	0,92	4,30	sama
DDRP-KRP	1,19	4,30	sama
KPA-KBS	3,45	4,30	sama
KPA-KRP	7,59	4,30	beda
KBS-KRP	0,45	4,30	sama

Lampiran 6. Data Interaksi Jamur *D. dickinsii* dengan Bakteri

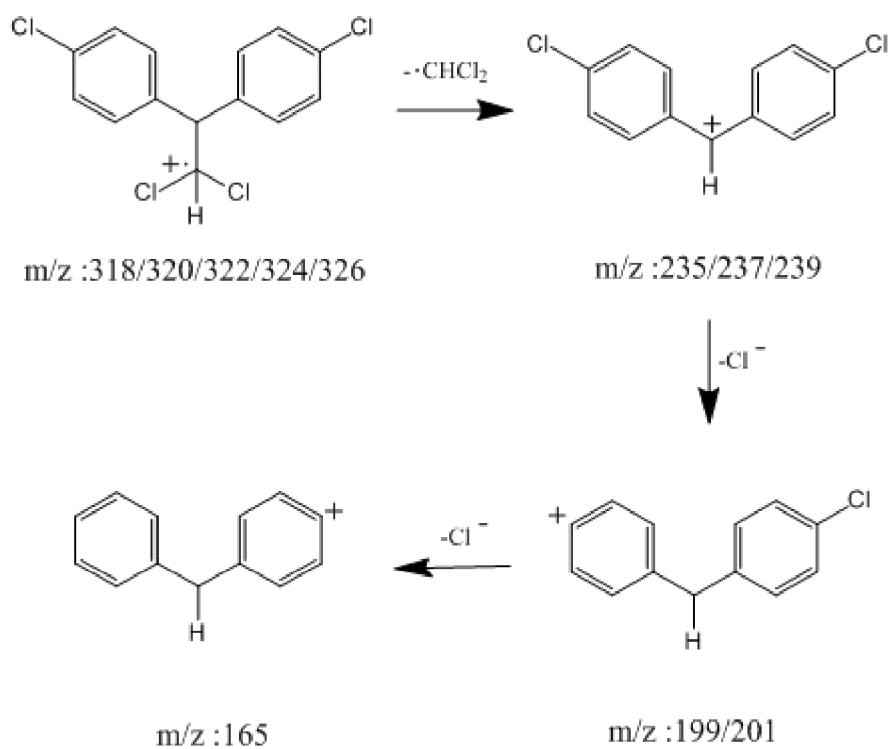
Tabel 1. Data hasil interaksi antara *D. dickinsii* dengan bakteri

Mikroorganisme	Sampel	Pertumbuhan Miselium (cm)							Pertumbuhan/ Hari	Rata-rata	SD
		h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7			
DDPA	T1	0,40	0,30	0,00	0,80	0,00	0,35	0,55	0,34	0,36	0,03
	T2	0,45	0,30	0,30	0,40	0,35	0,35	0,55	0,39		
	C1	0,40	0,35	0,35	0,40	0,45	0,30	0,35	0,37	0,37	0,01
	C2	0,40	0,30	0,20	0,45	0,30	0,40	0,50	0,36		
DDBS	T1	0,20	0,00	0,00	0,00	0,15	0,10	0,00	0,06	0,08	0,03
	T3	0,20	0,00	0,00	0,15	0,15	0,20	0,00	0,10		
	C1	0,50	0,60	0,60	0,40	0,45	0,60	0,10	0,46	0,44	0,03
	C2	0,40	0,50	0,50	0,30	0,50	0,60	0,15	0,42		
DDRP	T1	0,40	0,40	0,00	0,00	0,55	0,45	0,60	0,34	0,39	0,07
	T3	0,50	0,45	0,00	1,00	0,45	0,35	0,35	0,44		
	C1	0,50	0,35	0,30	0,60	0,40	0,40	0,70	0,46	0,45	0,02
	C2	0,40	0,40	0,50	0,45	0,30	0,40	0,65	0,44		

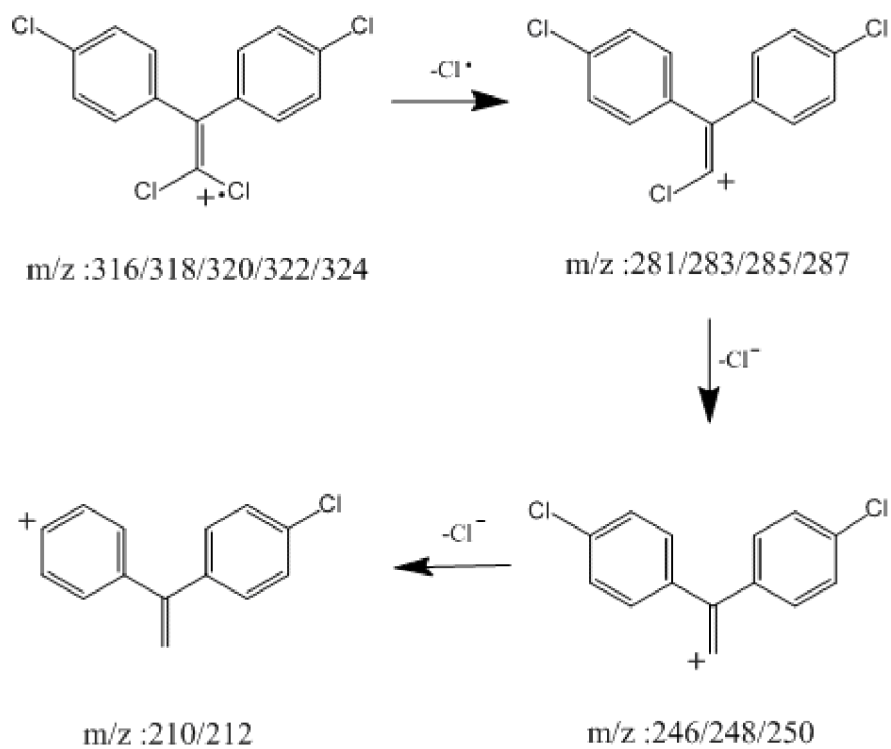
Lampiran 7. Fragmentasi Ion Hasil analisa GC-MS



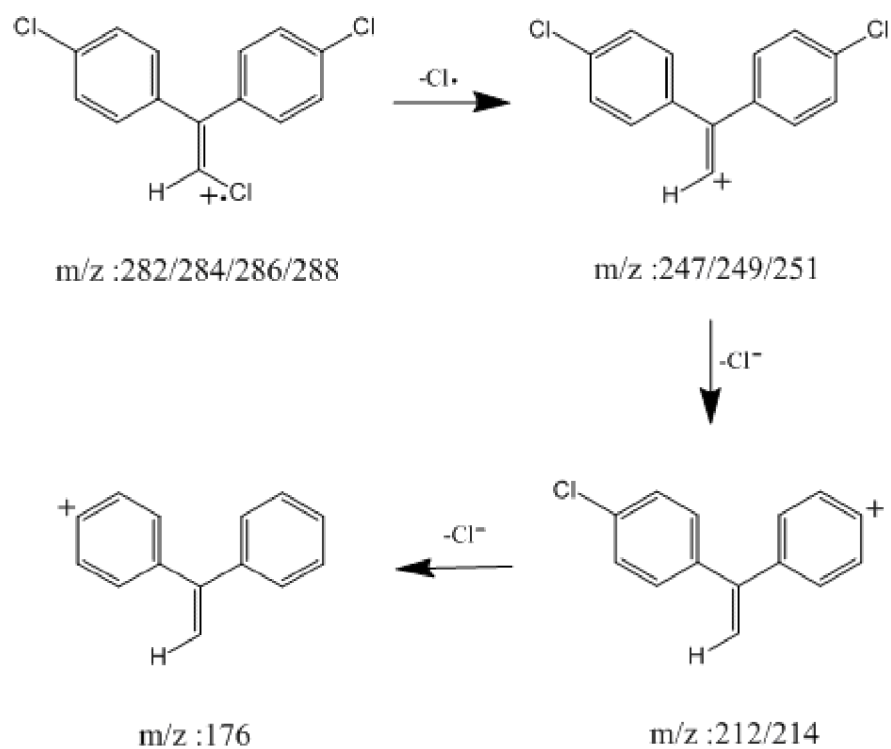
Gambar 1. Fragmentasi molekul DDT



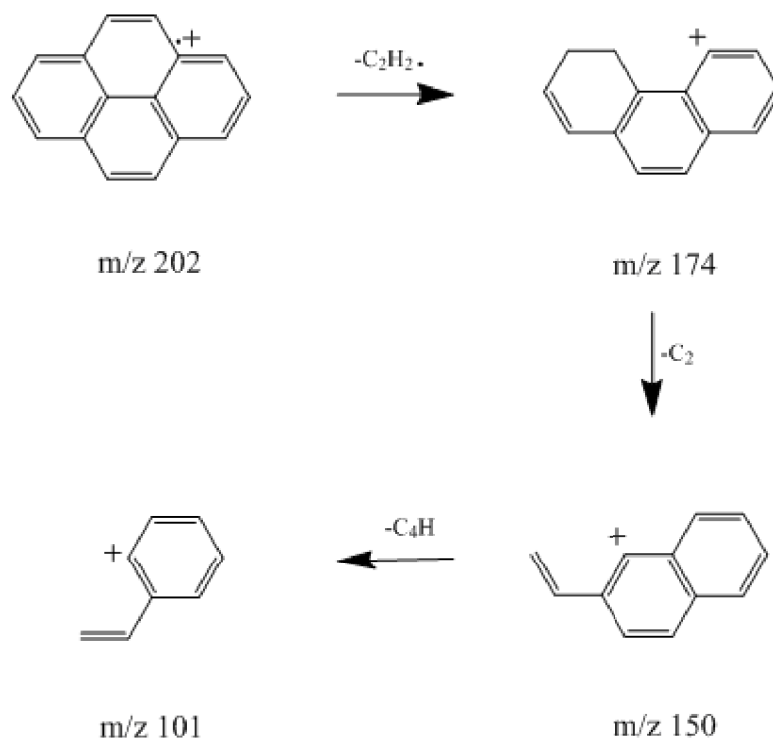
Gambar 2. Fragmentasi molekul DDD



Gambar 3. Fragmentasi molekul DDE



Gambar 4. Fragmentasi molekul DDMU



Gambar 5. Fragmentasi molekul Pirena

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Penambahan bakteri mampu meningkatkan kemampuan degradasi DDT oleh jamur *D. dickinsii*.
2. Peningkatan kemampuan degradasi DDT tertinggi diperoleh pada penambahan 10 mL ($1,05 \times 10^9$ CFU/mL) bakteri *P. aeruginosa* yaitu dari 53,61% (tanpa penambahan bakteri) menjadi 100%.
3. Untuk variasi waktu inkubasi penambahan bakteri pada hari ke 0 memberikan persen degradasi tertinggi yaitu 100%.
4. Degradasi DDT oleh *D. dickinsii* menghasilkan metabolit produk DDD dan DDE, sedangkan degradasi DDT oleh *P. aeruginosa* menghasilkan metabolit produk DDD dan DDMU. Degradasi DDT oleh kultur campuran *D. dickinsii* dengan *P. aeruginosa* menghasilkan metabolit produk DDD dan DDMU.
5. Hasil uji interaksi menunjukkan bahwa penambahan bakteri *P. aeruginosa* dan *R. pickettii* tidak memberikan hambatan terhadap pertumbuhan miselium *D. dickinsii*, sedangkan penambahan bakteri *B. subtilis* memberikan hambatan terhadap pertumbuhan miselium *D. dickinsii*.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi optimum (seperti suhu, pH, dan penambahan zat aditif) untuk meningkatkan kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*. Selain itu perlu dilakukan analisa lebih lanjut terkait kontribusi dan mekanisme masing-masing mikroorganisme dalam meningkatkan kemampuan degradasi DDT oleh *D. dickinsii*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Afriyanto (2008), *Kajian Keracunan Pestisida pada Petani Penyemprot Cabe di Desa Candi Kecamatan Bandungan Kabupaten Semarang*, Thesis Magister Kesehatan Lingkungan, Universitas Dipenogoro, Semarang
- Aislabie, J., Jones, G. L., (1995) *A Review of Bacterial Degradation of Pesticide*, Aust. J. Soil Res, 33:925-945.
- Arantes, V., Jellison, J., Goodell, B., (2012), *Peculiarities of Brown Rot Fungi and Biochemical Fenton Reaction with Regard to Their Potential as a Model for Bioprocessing Biomass*, Appl Microbiol Biotechnol, 94:323–338.
- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. ,(1968), *Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation characterization and its inhibition of fibrin clot formatio*, Biochem Biophys Res Commun, 31:488–494
- Ashari, K., (2013), *Pengaruh Penambahan Pseudomonas aeruginosa Terhadap Biodegradasi DDT Oleh Pleurotus ostreatus*, Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Atlas, RM., (1981), *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective*, Microbiol Rev, 45(1):180-209.
- Bae, K.G., Min, T.J., (2000), *The structure and antibiotic activities of hydroxy acid of lanostenol compound in Daedalea dickinsii*, Bull. Korean Chem Soc., Vol 21(12):1199-1201.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., (2010), *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*, Appl Microbiol Biotechnol., 87:427-444.
- Barbusinski, K., (2009), *Fenton Reaction – Controversy Concerning The Chemistry*, Eco Chem and Eng J., vol. 16 No 3:347-358.
- Bidlan, R., (2003), *Studies on DDT degradation by bacterial strains*. Thesis, Central Food Technological Research Institute.
- Bollag, W.B., Bollag, J.M., (1992), *Biodegradation Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press Inc., New York.
- Cooney, J.J., (1984), *The Fate of Petroleum Pollutans In Fresh Water Ecosystem - Petroleum Microbiology*, Mac millan Publishing Co., New York.
- Dibble, J.T., Bartha R. (1979), *Effect of Environmental Parameters on The Biodegradation of Oil Sludge*, Appl Environ Microbiol, 37(4):729-739.

- Djarjah, N. M. dan Djarjah, A. S. (2001), *Budidaya jamur tiram*, Kanisius, Yogyakarta.
- Djojosumarto, P. (2008), *Pestisida dan Aplikasinya*, PT. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Eris, F. R. (2006), *Pengembangan Teknik Bioremediasi Dengan Shurry Bioreaktor Untuk Tanah Tercemar Minyak Diesel*, Thesis, Sekolah Pasca sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Foght, J., April, T., Biggar, K., Aislabie, J. (2001), *Bioremediation of DDT-Contaminated Soils: A review*, Bioremed J, 5:225-246
- Gadd, G.M., (2001), *Fungi in Bioremediation*, Cambridge University Press, New York.
- Harris, D. C., (2007), *Quantitative Chemical Analysis Seventh Edition*, W.H. Freeman and Company, New York.
- Hermansyah, F. T., (2013), *Pengaruh Penambahan Bacillus subtilis Terhadap Biodegradasi DDT Oleh Pleurotus ostreatus*, Skripsi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Harmita, A.P.T., (2006), *Analisa Fisiko Kimia*, UI Press, Jakarta.
- Indraningsih, Raphaella, W., (1998), *Residu Pestisida Organoklorin Serta Kemungkinan Bahayanya pada Ternak dan Manusia*, Wartazoa, Vol. 7 No.2.
- Jeon, H.J., Kim, M.N., (2015), *Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from Pseudomonas aeruginosa E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation*, Int Biodet & Biodeg, 103 (2015) 141-146.
- Jones, S.M., Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., (2012), *Bacillus subtilis SJ01 produces hemicellulose degrading multi-enzyme complexes*, Bio Res, 7(1):1294-1309.
- Kamei, I., Yoshida, T., Enami, D., Meguro, S., (2011), *Coexisting Curtobacterum bacterium promotes growth of White Rot Fungus Stereum sp*, Curr Microbiol, 64:173-178.
- Kaneko, S., Yoshitake, K., Itakura, S., Tanaka, H., Enoki, A. (2005), *Relationship Between Production of Hydroxy Radicals and Degradation of Wood, Crystalline Cellulose, and a Lignin Related Compound or Accumulation of Oxalic Acid in Cultures of Brown Rot Fungi*, J Wood Sci, 51:262–269.

- Kang, S., Liu, S., Wang, H., & Cai, W., (2016), *Enhanced degradation performances of plate-like micro/nanostructured zero valent iron to DDT*, J Hazard Mat, 145-153.
- Li, Y.Q., Liu, H.F., Tian, Z.L., (2008), *Diesel Pollution Biodegradation : Synergetic Effect of Mycobacterium and Filamentous Fungi*, Biomed & Env Sci, 21:181-187
- Lindner, D. L., (2011), *A New Species of Daedalea (Basidiomycota) and a Synopsis of Core Species in Daedalea sensu stricto*, Nort American Fungi J, Vol.6 No. 4:1-12.
- Madigans, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., (1998), *Biology of Microorganism*, 8th editions, Willians and Wilkins Co., Baltimore.
- Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., (2009), *Environmental Microbiology second Editio*, Academic Press Elsevier, UK.
- Marrs, T. C., Ballantyne, B. dan Wiley, J., (2004), *Pesticide toxicology and international regulation*, J. Wiley, England.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., (2001), *Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review*, Eng Geol., 60:371-380.
- Mulja, M., Suharman, (1995), *Analisis Instrumental*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Niemenmaa, O., (2008), *Monitoring of Fungal Growth and Degradation of Wood*, Academic Disertation in Microbiology University of Helsinki, Finland.
- Plaza, G.A., Ulfig, K., Brigmon, R.L., (2005), *Surface active properties of bacterial strain isolated from petroleum hydrocarbon bioremediated soil*, Pol J of Microbiol, vol 54(2):161-167.
- Presiden Republik Indonesia, (2009), Undang- Undang Republik Indonesia Nomor 32 tahun 2009 Tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup.
- Purnomo, A. S., Kamei, I., dan Kondo, R., (2008), *Degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi*. J biosci & bioeng, 105: 614–621.
- Purnomo, A. S., Kondo, R. Mori, T., (2010), *Involvement of Fenton reaction in DDT Degradation by Brown Rot Fungi*, Int Biodet & Biodeg, 64:560-565.
- Quensen, J.F., Mueller, S.A., Jain, M.K., Tiedje, J.M., (1998), *Reductive dechlorination of DDE to DDMU in marine sediment microcosms*, Sci, 280:722-724.

- Rahayu, K., (1990), *Enzim Mikroba*, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, PAU Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ryan, M.P., Pembroke J.T., Adley, C.C., (2006), *Ralstonia pickettii: a persistent gram negative nosocomial infectious organism*, J Hosp Infect, 62(3):278-284.
- Ryan, M.P., Pembroke, J.T., Adley, C.C., (2007), *Ralstonia pickettii in environmental biotechnology: potential and applications*, J App Microbiol, **103**(4),54-64.
- Sari A. A., Tachibana S., dan Itoh K., (2012), *Determination of co-metabolism for 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) degradation with enzymes from Trametes versicolor U97*, J biosci & bioeng, 114:176–181.
- Scheibenbogen, K., Zytner, R. G., Lee, H., Trevors, J. T., (1994), *Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by Pseudomonas aeruginosa UG2 biosurfactants and some chemical surfactants*, J Chem Technol Biotechnol, 59:53–59
- Skoog, D.A., Holler, J.F., Crouch, S.R., (1998), *Principles of Instrumental analysis sixth Edition*, Thomson Brooks/Cole, Canada.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, J.F., (2013), *Fundamentals of Analytical Chemistry Ninth Edition*, Mary Finch, USA.
- Soudmand, A.A., Ayatollahi, S.S., Mohabatkari, H., Zareie, M., Shariatpanahi, S.F., (2007), *The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media*, J Pet Sci Eng, 58:161–172
- Sudarmo, S. (1991), *Pestisida*, Kanisius, Yogyakarta
- Sudaryanto, A., Takahashi, S., Tanabe, S., (2007) *Persistent Toxic Substances in the Environment of Indonesia*, Dev in Env Sci, Vol. 7
- Sumardjo, D., (2008), *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta*, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Suprpti, (2012), *Pedoman Teknis Kajian Pestisida Terdaftar dan Beredar TA 2012*, Direktorat jendral Prasarana dan Sarana Direktorat Pupuk dan Pertanian Kementerian Pertanian, Jakarta.
- Thomas, M., Mardiah., Mustafa., Santoso, A. (2011), *Teknik Isolasi dan Kultur*, Laboratorium Terpadu Biomedik USU, Medan.

- Todar, K., (2008), *Pseudomonas aeruginosa*, Todar's Online Textbook of Bacteriology.
- Udiharto, M., (1996), *Bioremediasi minyak bumi*, Di dalam: Prosiding Pelatihan dan Lokakarya Peranan Bioremediasi dalam Pengelolaan Lingkungan; Cibinong. 24-28 Juni 1996, hlm 24-39.
- Walter MV., (1997), *Bioaugmentation and Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington DC.
- Wang, S., Nomura, N., Nakajima, T., Uchiyama, H., (2012), *Case Study of Relationship Between Fungi and Bacteria Associated With High-molecular-weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation*, J Biosci & Bioeng, 113(5): 624-630.
- Widdel, Friedrich., (2010), *Theory and Measurement of Bacterial Growth*, Grundpraktikum Mikrobiologie Universitat Bremen, German.
- World Health Organization, (1979), *Environmental Health Criteria: DDT and Its Derivatives*, WHO, Geneva
- Yani, M., Fauzi AM., Aribowo F., (2003), *Bioremediasi lahan terkontaminasi senyawa hidrokarbon*, Di dalam: Prosiding Seminar Bioremediasi dan Rehabilitasi Lahan Sekitar Perminyakan dan Pertambangan; Bogor. 20 Februari 2003, Forum Bioremediasi IPB, Bogor.
- Zang, Shuyan., Lian, Bin., (2008), *Synergistic Degradation of 2-naphtol by Fusarium proliferatum and Bacillus subtilis in Wastewater*, J Hazard Mat, 166:33-38.
- Zang, S., Lian, B., Wang, J., (2010), *Biodegradation of 2-naphthol and Its Metabolites by Coupling Aspergillus niger with Bacillus subtilis*, J Env Sci, 22(5) 669-674.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

RIWAYAT PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Hamdan Dwi Rizqi, dilahirkan di Surabaya, 1 September 1992. Penulis telah menempuh pendidikan formal di MI Haji Hasyim Surabaya, SMPN 14 Surabaya, SMAN 11 Surabaya dan Pendidikan S1 di Jurusan KIMIA FMIPA-ITS. Setelah mendapatkan gelar sarjananya, penulis melanjutkan studi S2 di jurusan Kimia FMIPA-ITS dengan beasiswa fresh graduate. Penulis tercatat sebagai mahasiswa S2 Kimia angkatan 2014 dengan NRP 1414 201 031 dan mengambil bidang keahlian BIOKIMIA. Penulis memiliki minat di bidang pengolahan limbah terutama di bidang Bioremediasi. Selama masa studi, penulis pernah menjadi pemakalah dalam konferensi internasional ISOC 2014 di Bali dan BaSIC 2016 di Malang. Pada masa akhir studi, penulis melakukan penelitian mengenai pengaruh penambahan bakteri terhadap biodegradasi DDT oleh *Daedalea dickinsii*. Penelitian yang dilakukan penulis di bawah bimbingan Bapak Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

Email : hamdan.c28@gmail.com